

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

## VACCINATION PAR BCG NORMAL ET BCG ISONIAZIDO-RÉSISTANT EN PRÉSENCE ET EN ABSENCE D'UN TRAITEMENT PAR L'ISONIAZIDE

par J. BRETEY et G. CANETTI (\*).

*(Institut Pasteur, Laboratoires de Recherches sur la Tuberculose)*

Des considérations théoriques [1], qui seront rappelées plus loin, nous ont incités à créer une souche de BCG isoniazido-résistante et à étudier son pouvoir immunisant, comparativement à celui du BCG standard. Cette étude a été faite, d'une part, chez des cobayes auxquels de l'isoniazide était administrée depuis le jour de la vaccination jusqu'à la surinfection d'épreuve, d'autre part chez des cobayes identiquement vaccinés, mais non traités par l'isoniazide. Enfin, un groupe témoin particulier a été constitué par des cobayes vaccinés avec du BCG mort.

### I. — PRÉPARATION DU BCG ISONIAZIDO-RÉSISTANT.

La souche de BCG isoniazido-résistante a été créée par quatre passages successifs d'une souche de BCG standard sur milieu de Löwenstein-Jensen additionné de 1  $\mu\text{g}$  d'isoniazide par centimètre cube de milieu pour le premier passage, de 5  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  pour le deuxième passage, de 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  pour le troisième et le

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 décembre 1956.

quatrième passage. Le second passage sur milieu de Löwenstein-Jensen additionné de  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  d'isoniazide a fourni une culture très abondante, dont l'aspect était semblable à celui d'une culture de BCG standard. C'est cette culture qui a servi à la vaccination des animaux. L'ensemencement de dilutions appropriées a montré que *tous* les individus bacillaires de la culture étaient résistants à au moins  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ . Ce BCG isoniazido-résistant, qu'il provienne d'un tube de milieu avec isoniazide ou d'un tube de milieu sans isoniazide, est catalase-négatif (technique de Middlebrook [2]). Le BCG d'origine est fortement catalase-positif.

## II. — VACCINATION ET ADMINISTRATION D'ISONIAZIDE.

La vaccination a porté sur 100 cobayes adultes, dont le poids était de 650 à 850 g. Un premier groupe de 40 cobayes a reçu par injection intramusculaire dans la cuisse droite une suspension saline de 1 mg (poids humide) de *BCG isoniazido-résistant*, provenant de la culture décrite plus haut, âgée de 24 jours. Un deuxième groupe de 40 cobayes a reçu le même jour une dose identique de la souche de *BCG standard* ayant servi à créer la souche isoniazido-résistante : culture sur milieu de Löwenstein, âgée de 22 jours. Enfin, un troisième groupe de 20 cobayes a reçu le même jour une injection intramusculaire, en suspension saline, de 1 mg de *BCG standard mort* (tué par la chaleur).

Vingt cobayes du premier groupe et 20 cobayes du second groupe ont été traités depuis le lendemain de la vaccination, et pendant quatre-vingt-un jours, par injection quotidienne sous-cutanée de 5 mg d'isoniazide. Le lendemain de l'arrêt de ce traitement, tous les animaux des trois groupes ont été éprouvés par voie intradermique avec 10 unités de tuberculine purifiée IP 48.

## III. — SURINFECTION D'ÉPREUVE.

Trois jours après l'arrêt de l'administration d'isoniazide, quatre-vingt-quatre jours après la vaccination, tous les cobayes survivants, au nombre de 88, ont été surinfectés, par injection intramusculaire dans la cuisse gauche, de  $1 \text{ cm}^3$  de culture de la souche H 37 Rv en milieu liquide de Dubos âgée de 9 jours et diluée de telle manière que la dose de bacilles injectée soit, d'après une échelle opacimétrique, de  $1/500$  de milligramme. L'ensemencement de dilutions appropriées a montré que le nombre de bacilles viables inoculés était de 52 000 par animal. Le même jour, 30 cobayes témoins ont reçu la même infection virulente. Aucun des animaux, vaccinés ou témoins, n'a reçu d'isoniazide pendant l'évolution de la surinfection d'épreuve.

Tous les cobayes vaccinés survivants, au nombre de 83, et

18 cobayes témoins ont été sacrifiés quatre-vingt-dix-neuf à cent douze jours après la surinfection, le jour moyen du sacrifice étant pour chaque groupe le cent cinquième. Deux cobayes ayant reçu du BCG mort et deux cobayes témoins sont morts spontanément pendant la même période et ont été ajoutés aux animaux sacrifiés pour l'évaluation de l'immunité. Auparavant, un seul animal, ayant reçu du BCG mort et surinfecté, était mort de tuberculose.

A l'autopsie de chaque animal, les ganglions locaux, satellites du point de surinfection (ganglions inguinaux internes et externes gauches et ganglions lombaires), ont été réunis et pesés ensemble. La rate a également été pesée. Le degré d'atteinte macroscopique de la rate, du foie et du poumon a été évalué, pour chacun de ces viscères, par un coefficient allant de 0 à 5 ; le degré d'atteinte de l'ensemble des ganglions locaux, par un coefficient allant de 0 à 3. L'atteinte macroscopique globale de l'animal a donc été évaluée par un coefficient allant de 0 à 18 (*coefficient lésionnel global*).

#### IV. — RÉSULTATS.

Les résultats de l'expérience seront considérés pour les six groupes d'animaux suivants :

*Groupe S. T.* : cobayes ayant reçu du BCG standard et traités par l'isoniazide (20 animaux).

*Groupe S. NT.* : cobayes ayant reçu du BCG standard et non traités par l'isoniazide (16 animaux).

*Groupe I. T.* : cobayes ayant reçu du BCG isoniazido-résistant et traités par l'isoniazide (16 animaux).

*Groupe I. NT.* : cobayes ayant reçu du BCG isoniazido-résistant et non traités par l'isoniazide (17 animaux).

*Groupe M.* : cobayes ayant reçu du BCG mort (16 animaux).

*Groupe Té.* : cobayes témoins (20 animaux).

L'ensemble des résultats est consigné dans le tableau I ; ceux ayant trait à l'immunité sont illustrés par la figure 1.

a) ALLERGIE PRODUITE PAR LA VACCINATION. — Les intradermo-réactions faites avant la surinfection, le quatre-vingt-deuxième jour après la vaccination, ont été lues à la vingt-quatrième et la quarante-huitième heure.

*Le diamètre maximum de la réaction à la quarante-huitième heure a été le suivant (moyenne de chaque groupe) : groupe S. T., 8,2 mm ; groupe I. T., 12,4 mm ; groupe M., 2,3 mm ; groupe S. NT., 12 mm ; groupe I. NT., 13,5 mm.*

*Le pourcentage de réactions à centre nécrotique, sur le total des réactions de chaque groupe, a été le suivant : groupe S. T.,*



5 p. 100 ; groupe I. T., 41 p. 100 ; groupe M., 0 p. 100 ; groupe S. NT., 25 p. 100 ; groupe I. NT., 53 p. 100.

Ainsi, l'allergie du groupe vacciné par le BCG mort a été très faible. L'allergie du groupe vacciné par le BCG standard et non traité par l'isoniazide, d'une part, et l'allergie des deux groupes vaccinés par le BCG isoniazido-résistant, d'autre part, ont été fortes et sensiblement les mêmes. Enfin, l'allergie du groupe vacciné par le BCG standard et traité par l'isoniazide a été plus faible que celle des trois groupes précédents. La différence est significative ; elle n'est cependant pas très grande. L'allergie de ce groupe est bien plus forte que celle du groupe vacciné par le BCG mort.

b) EVOLUTION DU POIDS PENDANT LA SURINFECTION. — Les changements de poids entre le jour de la surinfection et le jour du sacrifice ont été en moyenne les suivants : groupe S. T., — 5 p. 100 ; groupe I. T., + 5 p. 100 ; groupe M., — 11 p. 100 ; groupe S. NT., 0 p. 100 ; groupe I. NT., — 1 p. 100 ; groupe Té., — 11 p. 100.

Aucun de ces changements n'est significatif.

c) GRAVITÉ DE LA TUBERCULOSE DE SURINFECTION. — L'atteinte des ganglions locaux satellites du point de surinfection a été maxima pour les groupes témoins (poids moyen des ganglions : 1,7 g) et pour le groupe ayant reçu du BCG mort (1,6 g) ; presque identique pour le groupe S. T. (1,5 g) ; un peu moindre pour le groupe S. NT. (1,3 g) ; enfin, elle a été notablement moindre pour les deux groupes I. NT. (0,53 g) et I. T. (0,45 g). Chez la majorité des animaux de ces deux derniers groupes, les ganglions n'étaient pas caséifiés.

Les critères les plus importants, pour évaluer la gravité de la tuberculose de surinfection, ont été *le poids de la rate et le coefficient lésionnel global*. Le poids de la rate a été maximum pour les groupes Té. (3,2 g) et M. (2,9 g), nettement moindre pour le groupe S. T. (1,8 g), et minimum pour les groupes I. NT. (1,1 g) et I. T. (1,1 g). Si l'on rapporte ces poids au poids total de l'animal lors du sacrifice, la tendance des résultats reste la même, mais les différences s'accroissent un peu (fig. 1).

Le coefficient lésionnel global (maximum possible : 18) a été le plus élevé dans le groupe M (9,5) et dans le groupe Té. (9,2), nettement moindre dans le groupe S. T. (6,4), encore moindre dans le groupe S. NT. (5,5), et très bas dans les groupes I. T. (2,1) et I. NT. (1,8). La tendance des résultats est donc la même que celle notée pour les poids de la rate.

On peut considérer un critère différent, le *coefficient lésionnel*

*viscéral*, qui exclut les ganglions locaux et ne tient compte que de l'atteinte de la rate, du foie et du poumon, c'est-à-dire du degré de généralisation de l'infection. Ce critère se légitime par le fait que même des bacilles de virulence très atténuée peuvent produire chez le cobaye de grosses atteintes ganglionnaires locales : c'est par des atteintes *viscérales* précoces et non régres-

Immunité conférée par BCG Standard  
et BCG Isoniazido-Résistant en présence  
et en l'absence d'un traitement par  
l'isoniazide.

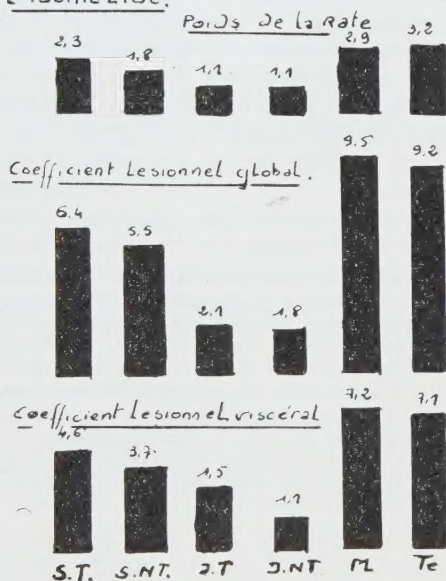


FIG. 1.

sives que se manifeste le plus sûrement une tuberculose virulente. Les résultats obtenus avec ce critère figurent au tableau I. La tendance des faits reste la même ; mais ceux observés chez les deux groupes d'animaux vaccinés avec le BCG standard sont plus proches de ceux observés chez les animaux vaccinés avec le BCG isoniazido-résistant qu'ils ne le sont avec le critère précédent.

Au total, les résultats de cette expérience de vaccination restent sensiblement les mêmes quel que soit le critère employé pour évaluer la gravité de la tuberculose de surinfection. Dans le groupe vacciné par le BCG mort, l'immunité a été nulle : les

TABEAU I. — Allergie et immunité conférées par BCG normal et BCG isoniazido-résistant en présence et en l'absence d'un traitement par l'isoniazide.

Allergie <sup>(1)</sup>				Immunité révélée par la surinfection <sup>(2)</sup>					
				Variation du poids des cobayes au cours de l'infect. virulente:			Atteinte des organes		
				(3)	(4)	Changt:	(5)	(6)	(7)
Groupe:	Nombre d'animaux	Diam. moyen (en mm)	% réact. nécroty.	Poids Avant	Poids Après		Rate	Coeff. lésionnel global	Coeff. lésionnel viscéral
S.T.	20	8,2	5	750	710	-5%	2,3	6,4	4,6
S.NT.	16	12	25	760	760	0%	1,8	5,5	3,7
I.T.	16	12,4	41	760	800	+5%	1,1	2,1	1,5
I.NT.	17	13,5	53	820	810	-1%	1,1	1,8	1,1
M.	16	2,3	0	760	670	-11%	2,9	9,5	7,2
Té.	20			760	680	-11%	3,2	9,2	7,1

(1) Allergie recherchée quatre-vingt-un jours après la vaccination, par 10 unités de IP 48 intradermique. Résultats à la quarante-huitième heure. — (2) Surinfection faite quatre-vingt-quatre jours après la vaccination; injection, par voie intramusculaire, de 52 900 bacilles de la souche H 37 Rv. — (3) Quatre-vingt-quatre jours après la vaccination, le jour de la surinfection virulente. Poids moyen des cobayes, par groupe. — (4) Le jour du sacrifice, en moyenne cent cinq jours après la surinfection. — (5) Poids moyen, en grammes. — (6) Lésions cotées de 0 à 5 pour la rate, 0 à 5 pour le foie, 0 à 5 pour le poumon, 0 à 3 pour les ganglions locaux: soit 0 à 18 pour l'ensemble des lésions. — (7) Même cotation que pour (6), mais avec exclusion des ganglions locaux (maximum possible 15).

lésions ont été les mêmes que chez les animaux témoins. Dans les deux groupes vaccinés par le BCG isoniazido-résistant, l'immunité a été la meilleure, et l'on n'a pas noté de différence significative selon qu'il y a eu ou non administration d'isoniazide. Enfin, dans les deux groupes d'animaux vaccinés par le BCG standard, l'immunité a été intermédiaire; elle a été bien plus forte que chez les animaux témoins, mais plus faible que chez les animaux vaccinés par le BCG isoniazido-résistant. L'administration d'isoniazide aux animaux vaccinés par le BCG standard n'a pas inhibé de manière significative le développement de l'immunité.

## V. — DISCUSSION.

Parmi les faits qui viennent d'être rapportés, il y a lieu d'examiner plus particulièrement la différence de pouvoir immunisant entre BCG mort et BCG standard suivi d'un traitement par l'iso-



niazide ; la différence entre BCG isoniazido-résistant et BCG standard ; enfin, l'influence qu'exerce un traitement par l'isoniazide sur l'immunité produite par le BCG standard.

En premier lieu, on note que l'immunité produite par le BCG standard (isoniazido-sensible) dans un organisme *traité par l'isoniazide pendant le développement de l'immunité vaccinale* est beaucoup plus forte que celle produite par une dose identique de BCG tué par la chaleur. On sait d'ailleurs que même des doses beaucoup plus fortes de BCG tué, ou de bacilles virulents tués, ne produisent chez le cobaye qu'une immunité très faible, de nombreuses expériences l'ont démontré. Puisque l'action affaiblissante exercée par le chauffage à 110° sur le pouvoir immunisant du BCG est considérablement plus marquée que celle exercée par l'isoniazide, il est rationnel d'admettre que, toute question de *nombre* de corps bacillaires mise à part, il se produit sous l'action de la chaleur une *dénaturation* des antigènes bacillaires immunisants, et qu'une dénaturation comparable ne se produit pas sous l'action de l'isoniazide.

En second lieu, dans ces expériences, le pouvoir immunisant du BCG isoniazido-résistant est apparu plus élevé que celui du BCG standard. On sait qu'il existe des différences de pouvoir immunisant appréciables entre diverses souches de BCG (surtout lorsqu'elles ont été entretenues de manière différente) [6]. Mais, dans l'expérience rapportée ici, le BCG isoniazido-résistant a été comparé à la souche standard même dont il était issu, ce qui rend très peu probable l'intervention du facteur de variation qui vient d'être signalé. Le nombre d'animaux employés dans cette expérience, toutefois, est beaucoup trop faible pour que la différence entre les deux variétés de BCG puisse être tenue pour certaine, surtout si l'on tient compte des incertitudes inhérentes à toute expérience de surinfection où la dose surinfectante n'est pas élevée. On peut simplement dire que le BCG isoniazido-résistant employé ici — catalase-négatif — vaccine de manière satisfaisante. Un BCG résistant à 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  d'isoniazide n'aurait donné à Ogata (cité par Toda [2 bis]) qu'une immunité inférieure à celle du BCG normal.

En troisième lieu, l'influence de l'administration d'isoniazide *depuis le moment de la vaccination* sur l'allergie et l'immunité produites par le BCG standard, mérite une attention toute particulière, car elle a des incidences profondes sur deux problèmes : celui du mécanisme de l'immunisation en général, et celui de l'association vaccination-chimioprophylaxie. Chez les animaux vaccinés par le BCG standard et traités, *l'allergie* est plus faible que chez les animaux identiquement vaccinés et non traités. La différence notée est significative ; elle n'est cependant pas très grande : elle est moindre que celle notée par Choremis et ses

collaborateurs [3] chez des enfants soumis à une expérience analogue. En matière d'immunité, la différence entre les deux groupes de cobayes est moins grande encore et elle n'est plus significative. Contrastant avec ce résultat, une expérience récente de Dubos et Schaefer [4] a montré que chez des souris ayant reçu une dose très faible de bacilles virulents, un traitement immédiat par l'isoniazide à très forte dose affaiblit de manière marquée l'immunité consécutive.

L'absence d'action inhibitrice prononcée de l'isoniazide sur le pouvoir immunisant du BCG, dans les conditions expérimentales réalisées ici, peut être due à plusieurs causes. On peut concevoir que l'isoniazide agisse *in vivo* beaucoup moins fortement sur une souche à multiplication très faible, comme le BCG, qu'elle n'agit sur une souche virulente. L'action de l'isoniazide sur la survie du BCG dans l'organisme du cobaye n'a pas encore été étudiée de manière précise. Chez l'homme, Aronson, Taylor et Kirle [5] ont observé qu'un traitement par l'isoniazide, commencé quarante-sept jours après vaccination intradermique par BCG, n'exerce pas d'influence appréciable sur la cicatrisation de l'ulcération locale.

On peut concevoir aussi que, toute question de multiplication ou de survie du BCG *in vivo* mise à part, une dose de 1 mg de BCG ( $3 \times 10^6$  corps bactériens), dans l'expérience présente, apporte au cobaye une dose d'antigènes immunisants très appréciable, pour peu que ces antigènes ne subissent pas une dénaturation brutale, comme celle opérée par la chaleur. Enfin, il y a lieu de remarquer que la souche BCG standard employée contenait un mutant résistant à  $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  d'isoniazide sur  $10^4$  bacilles, un mutant résistant à  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  d'isoniazide sur  $10^5$  bacilles : en inoculant à l'animal  $3 \times 10^6$  de bacilles, on lui a donc inoculé  $3 \times 10^2$  mutants résistants à  $0,1 \mu\text{g}$ , parmi lesquels 30 mutants résistants à  $5 \mu\text{g}$ . Etant donné que la surinfection n'a eu lieu que quatre-vingt-quatre jours après la vaccination, il n'est pas exclu que ces mutants aient fait un apport utile à l'édification de l'immunité.

L'incidence de ces constatations sur le problème pratique de l'association vaccination-chimioprophylaxie ne peut encore être indiquée de manière certaine. L'utilité d'un vaccin BCG isoniazido-résistant avait été postulée sur la base théorique suivante [1] : l'administration d'isoniazide à des sujets exposés à la contagion, mais non encore infectés par le bacille tuberculeux (chimioprophylaxie) devrait les laisser sans résistance spécifique, le jour où l'administration d'isoniazide serait arrêtée. Or si, pour conférer à ces sujets une résistance spécifique, on les vaccinait dès l'instauration de la chimioprophylaxie par du BCG standard (isoniazido-sensible) — cette précocité de la vaccination étant



souhaitable pour laisser à l'immunité vaccinale le temps de s'installer — *l'isoniazide, en s'opposant à la multiplication du BCG, pourrait inhiber le développement de l'immunité* ; de là l'utilité d'un BCG isoniazido-résistant. Les expériences rapportées ici démontrent qu'avec une dose forte de BCG, l'inhibition de l'immunité n'est point marquée. Mais il y a lieu de remarquer que les doses de BCG introduites dans l'organisme humain par les méthodes de vaccination les plus fréquemment employées (vaccination par scarification, ou par injection intradermique) sont beaucoup plus faibles que celles employées ici, surtout si l'on tient compte de la différence de poids entre le cobaye et l'homme. Ainsi, chez un enfant de 15 kg vacciné par 1/20 de mg de BCG intradermique, la dose vaccinale n'atteint que le 1/400 de celle administrée ici. De nouvelles expériences sont nécessaires pour préciser l'effet de l'isoniazide sur une vaccination du cobaye quantitativement comparable à la vaccination habituelle de l'homme.

#### CONCLUSIONS ET RÉSUMÉ.

Une souche de BCG isoniazido-résistante a été préparée. Le pouvoir immunisant de cette souche a été comparé chez le cobaye à celui du BCG standard, en présence et en l'absence d'un traitement par l'isoniazide entrepris dès la vaccination, ainsi qu'à celle du BCG mort. Chez les animaux vaccinés par BCG mort, l'immunité spécifique a été nulle. Chez les animaux vaccinés par BCG isoniazido-résistant, l'immunité spécifique a été la plus forte ; elle n'a pas été influencée par l'administration précoce d'isoniazide. Enfin, chez les animaux vaccinés par le BCG standard, l'immunité spécifique a été intermédiaire ; elle n'a pas été diminuée de façon significative par l'administration précoce d'isoniazide, alors que l'allergie l'a été.

#### SUMMARY

##### VACCINATION BY NORMAL BCG AND INH-RESISTANT BCG, WITH AND WITHOUT ISONIAZID TREATMENT.

An INH-resistant strain of BCG has been prepared. The immunizing power of this strain has been compared in guinea-pigs, first to the immunizing power of standard BCG, with or without therapy by INH, and secondly to that of killed BCG. Guinea-pigs vaccinated with killed BCG showed no specific immunity. In guinea-pigs vaccinated with INH-resistant BCG, the specific immunity was the strongest ; it was not influenced

by early administration of INH. In guinea-pigs vaccinated with standard BCG, the specific immunity was not weakened by early administration of INH, whereas allergy has been decreased by the treatment.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] CANETTI (G.). *Rev. Tub.*, 1955, **19**, 1392 ; *Am. Rev. Tub.*, 1956, **74**, supplément, 13.
- [2] MIDDLEBROOK (G.). *Am. Rev. Tub.*, 1954, **69**, 471.
- [2 bis] TODA (T.). In *Rapports de la XIV<sup>e</sup> Confér. de l'Union Internat. contre la Tuberculose*, 1957. (A paraître.)
- [3] CHOREMIS (C.) et coll. *Am. Rev. Tub.*, 1956, **74**, 197.
- [4] DUBOS (R. J.) et SCHAEFER (N. B.). *Am. Rev. Tub.*, 1956, **74**, 541.
- [5] ARONSON (J. D.) et coll. *Am. Rev. Tub.*, 1956, **74**, 7.
- [6] DUBOS (R. J.) et PIERCE (C. H.). *Am. Rev. Tub.*, 1956, **74**, 699.

**L'APPARITION DE FORMES NON ACIDO-RÉSISTANTES  
DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*  
EN PRÉSENCE D'ISONIAZIDE, DE CYCLOSÉRINE  
ET DU THIOAMIDE  
DE L'ACIDE  $\alpha$ -ÉTHYL ISO-NICOTIQUE**

par J.-M. DUNBAR (\*) (\*\*).

(*Institut Pasteur, Service de la Tuberculose*)

La perte d'acido-résistance que subit le bacille tuberculeux lorsqu'il se multiplie en présence d'isoniazide a été décrite par de nombreux auteurs. Middlebrook [7] a observé que les bacilles qui ont poussé en présence de 0,1  $\mu$ g d'isoniazide par millilitre, sur milieu solide ou liquide, sont non acido-résistants dans une proportion d'au moins 90 p. 100.

Rist et Grumbach décrivent le même phénomène [12] et précisent [11] que cette perte d'acido-résistance se produit seulement lorsque l'isoniazide est ajouté à des bacilles en pleine croissance : elle n'apparaît pas si l'on ajoute l'isoniazide à une culture âgée qui a cessé de croître, ou si, à une culture jeune, on ajoute simultanément de l'isoniazide et de la streptomycine, qui arrête immédiatement la croissance. Par contre, si en même temps que l'isoniazide on ajoute du PAS, qui n'arrête pas immédiatement la croissance, l'isoniazide provoque la perte d'acido-résistance. Pour que le PAS empêche la perte d'acido-résistance, il faut l'ajouter à la culture plusieurs jours avant l'isoniazide [10].

Cette perte d'acido-résistance est accompagnée, non seulement par la perte du pouvoir de réduire le triphényl-tétrazolium (Koch-Weser et coll., 1953 et 1955), mais aussi par la perte de la viabilité (Schaefer, 1954). De plus, les bacilles qui ont ainsi perdu leur acido-résistance sont moins riches en lipides que les bacilles normaux (Russe et Barclay).

Depuis lors, Barclay et Russe ont montré que la cyclosérine modifie considérablement les propriétés tinctoriales de *M. tuberculosis*. En outre, Grumbach, Rist et Libermann ont découvert

(\*) Université de St-Andrews (Ecosse). Titulaire d'une bourse d'échange médical anglo-français de la Fondation Ciba.

(\*\*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 décembre 1956.



l'activité anti-tuberculeuse des thioamides des acides isonicotiques alkyl-substitués en position  $\alpha$ , et ont constaté que ces thioamides font également perdre au bacille tuberculeux son acido-résistance [2].

Nos recherches ont eu pour but de comparer l'effet de l'isoniazide (INH), de la cyclosérine (CS) et du thioamide  $\alpha$ -éthylisonicotique (TI) sur l'acido-résistance des bacilles tuberculeux en croissance ou à l'état de repos, et en présence de streptomycine (SM) ou de PAS.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES.

1° Pour obtenir des bacilles en pleine croissance, 0,05 mg (poids humide) de bacilles H37Rv, provenant d'une culture âgée de 8 jours en milieu liquide de Dubos [3], fut ajouté à une série de tubes contenant 5 ml de milieu de Dubos ou de milieu de Youmans [15] au sérum de bœuf (10 p. 100). Après quatre jours d'étuve à 38°, les tubes d'opacités analogues (environ 0,1 mg par millilitre) furent sélectionnés et additionnés des produits étudiés, aux concentrations suivantes (1) : INH, 0,2  $\mu\text{g/ml}$  ; TI, 2  $\mu\text{g/ml}$  ; CS, 50  $\mu\text{g/ml}$  ; ou des mêmes produits additionnés de SM, 5  $\mu\text{g/ml}$  ; ou de PAS, 5  $\mu\text{g/ml}$ .

2° Pour obtenir des bacilles au repos, une culture en milieu de Dubos, âgée de 4 semaines et arrivée au maximum de sa croissance, fut diluée avec de l'eau salée physiologique, pour obtenir une concentration bacillaire de 0,3 mg/ml et distribuée à raison de 5 ml par tube.

Ces tubes ont reçu les mêmes produits que plus haut, aux mêmes concentrations. Le PAS a été omis.

Par la même méthode nous avons préparé des bacilles au repos provenant d'une culture en milieu de Youmans au sérum.

Tous les tubes furent remis à l'étuve à 38° C après l'addition des médicaments.

La croissance fut observée tous les deux jours, pendant vingt et un jours. Elle fut évaluée en milieu de Youmans par une notation allant de 0 à 10 +, et en milieu de Dubos par comparaison opacimétrique avec une échelle préparée avec du BCG, étalonnée de 0,1 à 1 mg de bacilles par millilitre (poids humide).

Tous les deux jours, des frottis furent colorés par la méthode de Ziehl-Neelsen, décolorés par  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à 25 p. 100, et recolorés pendant dix minutes par le bleu de méthylène non dilué.

#### RÉSULTATS.

1° CULTURES EN PLEINE CROISSANCE. — Les relations entre la croissance et les résultats de la coloration de Ziehl-Neelsen sont indiqués dans le tableau I.

(1) En fait les modifications de l'acido-résistance apparaissent déjà aux concentrations suivantes : INH, 0,05  $\mu\text{g}$  ; TI, 0,5  $\mu\text{g}$  ; CS, environ 10  $\mu\text{g/ml}$ .

TABLEAU I. — Croissance des cultures et évolution de l'acido-résistance des bacilles H37Rv, en présence d'isoniazide, de thioamide  $\alpha$ -éthylisonicotique ou de cyclosérine, seuls ou en association avec la streptomycine ou le PAS. Les médicaments ont été ajoutés aux cultures quatre jours après l'ensemencement.

Médicaments Concentrations en $\mu$ g par ml	Ensemencement H37Rv	Nombre de jours après addition du médicament							
		Milieu Youmans				Milieu Dubos			
		0	2	4	6	0	2	4	6
INH. 0,2	0,05 mg	R 2	R+B 4	r+B 5	r+B 6	R < 0,1	R+b 0,3	r+B 0,4	r+B 0,5
		R 2	R+b 5	r+B 6	r+B 6	R < 0,1	R+b 0,3	r+B 0,4	r+B 0,5
		R 2	R 4	R 5	R 3	R < 0,1	R 0,1	R 0,1	R 0,1
T.I. 2,0	0,05 mg	R 2	R+b 5	r+B 6	r+B 7	R < 0,1	R+b 0,3	r+B 0,4	r+B 0,5
		R 2	R+b 6	r+B 6	r+B 6	R < 0,1	R+b 0,3	r+B 0,4	r+B 0,5
		R 2	R 3	R 3	R 2	R < 0,1	R 0,1	R 0,1	R 0,1
Cyclosérine 50	0,05 mg	R 2	r 2	r 2	r 2	R < 0,1	r < 0,1	r < 0,1	r < 0,1
		R 2	r 2	r 2	r 2	R < 0,1	r < 0,1	r 0,1	r 0,1
		R 2	r 3	r 3	r 2	R < 0,1	r < 0,1	r 0,1	r 0,1

Les symboles indiquent les résultats de la coloration de Ziehl-Neelsen : R = formes acido-résistantes seulement ; r = un petit nombre de bacilles, tous acido-résistants ; R+B = environ 50 p. 100 acido-résistants, 50 p. 100 non acido-résistants (bleus) ; R+b = plus de 80 p. 100 acido-résistants ; r+B = plus de 80 p. 100 non acido-résistants. Les chiffres indiquent la richesse de la culture, évaluée de 0 à 10 + en Youmans et de 0 à 1 mg/ml en Dubos.

Après quarante-huit heures de contact avec l'isoniazide ou le thioamide de nombreux bacilles ont perdu leur acido-résistance et ne sont colorés que par le bleu. Après quatre jours de contact, plus de 90 p. 100 des bacilles ont perdu leur acido-résistance.

Le résultat est particulièrement spectaculaire en milieu de Youmans, où l'on observe des cordes entières totalement bleues, où se reconnaissent nettement les éléments bacillaires bleus (pl. fig. 3 et 4). Ces bacilles contiennent un granule central fortement coloré, ou, le plus souvent, deux granules sub-polaires. Dans les cordes, où les bacilles sont parallèles, les granules sont souvent tous placés au même niveau, dessinant à ce niveau une striation transversale de la corde.

Ces bacilles non acido-résistants, bien colorés, contenant un ou deux granules très foncés, se distinguent nettement des bacilles bleus « naturels » que l'on observe souvent dans les cultures

jeunes ou très vieilles, sans addition de médicament. Ces bacilles bleus « naturels » sont très fins, très pâles et souvent constitués de multiples granulations.

On observe aussi quelques bacilles nettement acido-résistants, orientés le long du grand axe des cordes bleues, ou plus rarement obliquement. On peut admettre que les bacilles acido-résistants résiduels sont les uns des bacilles morts ou au repos, les autres des bacilles chimio-résistants. La présence de ces derniers explique que, tardivement, les bacilles acido-résistants redeviennent beaucoup plus nombreux que les non acido-résistants.

En présence de cyclosérine, les cordes prennent un aspect tout différent : les bacilles perdent leur forme et leur individualité, et sont remplacés par une masse bleu pâle, dessinant des « cordes fantômes » (pl., fig. 5 et 6). Quelques bacilles restent cependant acido-résistants, mais sont souvent très épaissis. Ils sont disposés irrégulièrement à l'intérieur des « cordes fantômes » (pl., fig. 5 et 6).

Barclay et Russe ont observé la perte d'acido-résistance et la désintégration des bacilles sous l'influence de la cyclosérine, en milieu de Dubos. Dans le même milieu, ce phénomène a échappé à Hudgins, Patnode et Cummings, qui écrivent [4] « cycloserine had no effect on the acid-fast staining properties of the organisms ». On peut expliquer cette contradiction par le fait que, en milieu de Dubos, les bacilles altérés par la cyclosérine sont dispersés et qu'il est très difficile de les reconnaître avec certitude comme des débris bacillaires, alors que les bacilles acido-résistants résiduels, relativement nombreux, attirent fortement l'attention. En milieu de Youmans, au contraire, les bacilles altérés restent agglomérés sous forme d'amas, qu'on reconnaît aisément comme les restes des cordes bacillaires. En revanche, le milieu de Dubos est à recommander si l'on veut colorer finement les bacilles altérés par l'isoniazide ou le thioamide.

Quant à la croissance, on voit sur le tableau I que la cyclosérine l'arrête presque immédiatement, alors que l'isoniazide et le thioamide l'arrêtent plus tardivement. Plus tard, en présence de cyclosérine l'opacité des cultures diminue (Barclay et Russe), traduisant le même phénomène de lyse que la transformation des cordes en amas bleuâtres.

Lorsque la streptomycine est ajoutée en même temps que l'isoniazide ou le thioamide, la croissance s'arrête immédiatement (surtout en milieu de Dubos) et la perte d'acido-résistance ne se produit pas.

Par contre, la streptomycine ne modifie en rien l'action de la cyclosérine. Rappelons que, en revanche, selon Barclay et Russe, les bacilles auxquels on ajoute simultanément de la cyclosérine



et de l'isoniazide prennent l'aspect typique de bacilles touchés par l'isoniazide seul et non l'aspect des bacilles touchés par la cyclosérine seule.

Si l'on ajoute du PAS en même temps que l'isoniazide, le thioamide ou la cyclosérine, la perte d'acido-résistance survient comme en l'absence de PAS.

Bien entendu, le PAS, comme la streptomycine, empêche le développement de la résistance aux médicaments, qui se manifeste par la reprise tardive de la croissance, lorsque l'isoniazide, le thiamide ou la cyclosérine sont employés seuls.

2° CULTURES AU REPOS. — Dans celles-ci, l'addition d'isoniazide ou de thioamide n'a provoqué aucune perte d'acido-résistance. L'addition de cyclosérine n'a pas provoqué l'apparition de « cordes fantômes ».

3° COLORATIONS DIVERSES. — On a appliqué diverses colorations à des frottis de cultures où environ 99 p. 100 des bacilles avaient perdu leur acido-résistance sous l'influence du thioamide ou de l'isoniazide. Les bacilles se laissent colorer intensément par la fuchsine phéniquée diluée à froid, ou par le bleu de méthylène. Ils sont également bien colorés par la méthode de Gram ou par celle de Giemsa. On sait que les bacilles tuberculeux normaux et acido-résistants se laissent très difficilement colorer par ces différentes techniques (pl., fig. 2), de même que les bacilles tuberculeux non acido-résistants « naturels » que l'on trouve dans la plupart des cultures et particulièrement en milieu de Dubos.

La perte d'acido-résistance, sous l'influence de l'isoniazide ou du thioamide, est tellement prononcée que l'acide sulfurique à 1 p. 100 suffit à en extraire totalement la fuchsine et à rendre les bacilles invisibles avant la recoloration par le bleu de méthylène.

#### DISCUSSION.

L'isoniazide et le thioamide  $\alpha$ -éthylisonicotique, tous deux dérivés de l'acide isonicotique, provoquent la perte d'acido-résistance du bacille tuberculeux dans les mêmes conditions : tous deux agissent seulement sur les bacilles en voie de multiplication ; ils n'agissent pas en présence de streptomycine ; l'acido-résistance disparaît seulement après une à deux divisions cellulaires en présence du médicament. Ajoutons que dans les deux cas, les bacilles non acido-résistants semblent avoir perdu leur viabilité.

Malgré cette identité dans les modalités d'action, on ne peut conclure que le mécanisme d'action des deux substances soit le même, puisque le thioamide est actif sur les bacilles résistants

à l'isoniazide et l'isoniazide actif sur les bacilles résistants au thioamide [2].

La cyclosérine, par contre, agit selon des modalités bien différentes, c'est-à-dire par « désintégration des bacilles » (Barclay et Russe). Cette désintégration n'a pas lieu si les bacilles sont au repos, mais n'est cependant pas empêchée dans une culture en pleine croissance par l'action de la streptomycine, que celle-ci soit préalable (Barclay et Russe) ou simultanée, comme dans nos expériences, à celle de la cyclosérine. Enfin la désintégration apparaît sans aucune multiplication préalable des bacilles en présence de l'agent toxique.

Rappelons enfin que la streptomycine, bactéricide elle aussi *in vitro*, n'exerce aucune action sur l'acido-résistance.

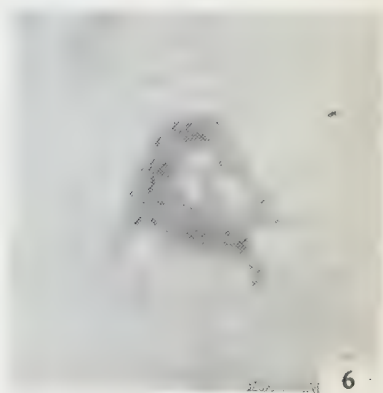
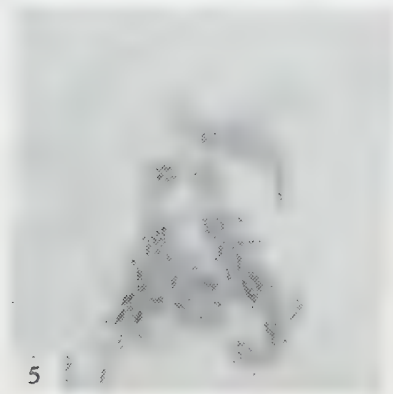
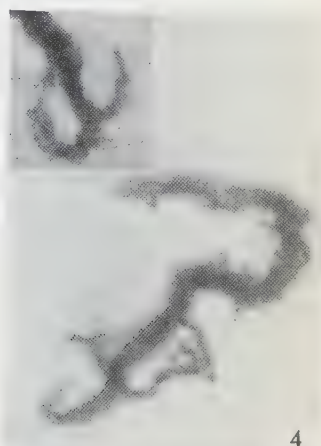
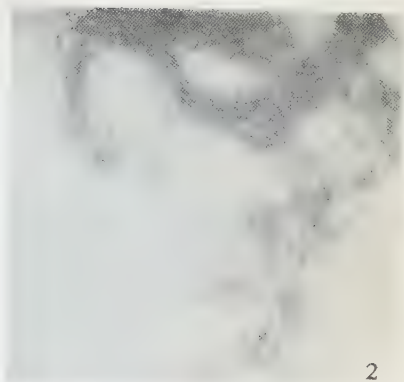
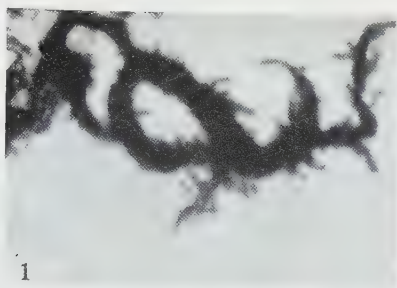
Ces faits montrent qu'on ne peut caractériser l'activité *in vitro* d'un agent antibactérien en notant simplement un chiffre, celui de la concentration bactériostatique ou bactéricide. Les modalités qualitatives de son activité sont au moins aussi importantes et caractéristiques.

Prenons l'exemple de la cyclosérine. Son pouvoir bactériostatique s'exerçant *in vitro* à des concentrations relativement élevées, variant entre 5 et 15  $\mu\text{g}$  par millilitre, plusieurs auteurs ont considéré comme « paradoxale » son activité antituberculeuse chez l'homme [8, 9]. Mais si l'on tient compte de sa puissante action désintégrante sur le bacille, le paradoxe disparaît sans qu'il soit nécessaire d'invoquer un mécanisme d'action indirect, s'exerçant par l'intermédiaire de l'hôte, ou après transformation dans l'organisme.

D'un point de vue clinique, il n'est pas impossible que la rapide disparition des bacilles dans les expectorations sous l'influence de l'isoniazide soit due à la perte de l'acido-résistance et non à une réelle absence de bacilles. Cette hypothèse n'a jamais pu être vérifiée et nous ignorons si la perte de l'acido-résistance survient *in vivo*, dans les lésions et dans les macrophages. En tout état de cause, si les bacilles non acido-résistants que nous avons étudiés *in vitro* existent dans les expectorations et passent inaperçus, ils semblent être sans danger, puisque les

#### LÉGENDE DE LA PLANCHE

1. Ziehl-Neelsen. Culture en milieu de Youmans-sérum, sans addition d'antibiotique. Corde entièrement acido-résistante, rouge. — 2. Même culture, colorée uniquement par le bleu de méthylène non dilué, pendant dix minutes. Le bleu ne colore qu'un petit nombre de bacilles, et beaucoup moins intensément que sur 3 et 4. — 3, 4, 5, 6. Ziehl-Neelsen. Cultures en milieu de Youmans-sérum, quatre jours après addition d'isoniazide (3), de thioamide (4) ou de cyclosérine (5 et 6).







bacilles non acido-résistants — du moins ceux qui sont la signature de l'activité de l'isoniazide ou du thioamide — semblent avoir perdu leur viabilité.

#### CONCLUSIONS.

1° Les bacilles tuberculeux de la souche H37Rv cultivée en présence de thioamide  $\alpha$ -éthyl-isonicotique (2  $\mu$ g par millilitre) perdent leur acido-résistance et ne deviennent visibles qu'après recoloration. Les bacilles se présentent alors sous une forme qui rappelle les bacilles du groupe diphtérique.

2° Ces bacilles non acido-résistants se colorent aisément par les colorants courants, ainsi que par les méthodes de Gram et de Giemsa.

3° La présence de streptomycine (5  $\mu$ g par millilitre) empêche l'action du thioamide sur l'acido-résistance, tandis que le PAS ne l'empêche pas.

Ces faits montrent que le thioamide étudié agit, sinon par le même mécanisme, du moins avec les mêmes modalités que l'isoniazide.

4° Si l'on ajoute de la cyclosérine (50  $\mu$ g par millilitre) à des cultures de bacilles tuberculeux en milieu de Youmans au sérum, on voit apparaître de nombreuses « cordes fantômes » non acido-résistantes, qui ne contiennent qu'un petit nombre de formes bacillaires acido-résistantes. La présence de streptomycine ne modifie pas ce phénomène.

5° Les propriétés tinctoriales des bacilles au repos ne sont pas modifiées par l'addition d'isoniazide, de thioamide isonicotique ou de cyclosérine.

#### SUMMARY

##### APPEARANCE OF NON-ACID FAST FORMS OF *Mycobacterium tuberculosis* IN THE PRESENCE OF ISONIAZID, CYCLOSERINE AND $\alpha$ -ETHYL-THIOISONICOTINAMIDE.

1. H37Rv strain of *Mycobacterium tuberculosis* when grown in a suitable concentration of  $\alpha$ -ethyl-thioisonicotinamide (2,0  $\mu$ g/ml) loses the property of acid-fastness in the Ziehl-Neelsen staining technique and is demonstrable only by the use of a counterstain. Such non-acid fast forms present a similar morphology to diphteria group organisms.

2. These non-acid fast forms are readily demonstrable by simple, Gram and Giemsa staining procedures.

3. The presence of streptomycin (5  $\mu$ g/ml) prevents this loss of acid-fastness associated with the presence of  $\alpha$ -ethyl-thio-

isonicotinamide (2,0 µg/ml) while PAS (5 µg/ml) fails to do so.

These facts show that  $\alpha$ -ethyl-thioisonicotinamide, if, not working by the same mechanism, produces the same phenomena as isoniazid.

4. Liquid culture growths using Youmans' medium with 10 % bovine serum in the presence of cycloserine 50 µg/ml yields large numbers of « ghost cords » with only a few bacillary outlines discernable within the serpentine « cord » boundaries. The phenomenon is not modified by the presence of streptomycin.

5. The staining reactions of « resting bacilli » remain unchanged in the presence of isoniazid, thioisonicotinamide and cycloserine.

★ ★

Je prie le professeur Jacques Tréfouël, directeur de l'Institut Pasteur, et le D<sup>r</sup> Jean Bretey, chef du Service de la Tuberculose, de recevoir mes remerciements pour leur accueil à l'Institut Pasteur, ainsi que le D<sup>r</sup> Noël Rist qui m'a guidé et aidé dans mon travail.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BARCLAY (W. R.) et RUSSE (H.). *Am. Rev. Tub.*, 1955, **72**, 236.
- [2] GRUMBACH (F.), RIST (N.), LIBERMANN (D.), MOYEUX (M.), CALS (S.) CLAVEL (S.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 2187.
- [3] DUBOS (R. J.) et MIDDLEBROOK (G.). *Am. Rev. Tub.*, 1947, **56**, 334.
- [4] HUDGINS (P. C.), PATNODE (R. A.) et CUMMINGS (M. M.). *Am. Rev. Tub.*, 1955, **72**, 685.
- [5] KOCH-WESER (D.), BARCLAY (W. R.), EBERT (R. H.) et LEE (V. S.). *J. Lab. Clin. Med.*, 1953, **42**, 828.
- [6] KOCH-WESER (D.), BARCLAY (W.) et EBERT (R.). *Am. Rev. Tub.*, 1955, **71**, 556.
- [7] MIDDLEBROOK (G.). *Am. Rev. Tub.*, 1952, **65**, 765.
- [8] MULINOS (G.). *Third Annual Symposium on Antibiotics*, Washington, novembre 1955.
- [9] RAVINA (A.) et PESTEL (M.). *Presse méd.*, 1956, **64**, 1241.
- [10] RIST (N.). *Bull. Un. int. contre la Tub.*, 1953, **23**, 417.
- [11] RIST (N.) et GRUMBACH (F.). *Rev. Tub.*, 1952, **15**, 665.
- [12] RIST (N.), GRUMBACH (F.), CALS (S.) et RIEBEL (J.). *Ann. Inst Pasteur*, 1952, **82**, 757.
- [13] RUSSE (H.) et BARCLAY (W. R.). *Am. Rev. Tub.*, 1955, **72**, 713.
- [14] SCHAEFER (W. B.). *Am. Rev. Tub.*, 1954, **69**, 125.
- [15] YOUMANS (G. P.). *Am. Rev. Tub.*, 1947, **55**, 590.



# ÉTUDES SUR LE COLLAGÈNE

## X — MODIFICATIONS APPORTÉES AUX COMBINAISONS IN VITRO COLLAGÈNE-MUCOPOLYSACCHARIDES PAR DES POLYOSIDES BACTÉRIENS

par Suzanne BAZIN et Albert DELAUNAY (\*).

(C. N. R. S. et Institut Pasteur,  
Annexe de Garches)

### Introduction.

Dans un mémoire précédent [1], nous avons indiqué comment la précipitation du collagène A par différents corps (héparine, acide chondroïtine-sulfurique, lipopolysaccharide [endotoxine] typhique, polysides typhique et staphylococcique, polysides extraits du carragaheen et d'une levure, glycine, glycyL-glycine, di-glycyl-glycine, peptone dialysée) pouvait être modifiée par la présence, dans le milieu, de doses variables de chlorure de sodium. Nous voudrions, dans ce nouveau travail, montrer ce qu'il advient des combinaisons collagène A-mucopolysaccharides quand elles doivent se produire en présence de polysides bactériens.

### Technique expérimentale.

#### MATÉRIEL UTILISÉ.

I. SOLUTION DE COLLAGÈNE A. — Elle a été préparée selon les indications classiques de Nageotte [2].

II. SOLUTIONS CONTENANT EN MÉLANGE UN MUCOPOLYSACCHARIDE ET UN POLYOSIDE BACTÉRIEN. — 1° *Mucopolysaccharides* — Ont été retenus l'héparine (H.) et l'acide chondroïtine-sulfurique (A. Ch. S.).

Dans deux mémoires précédents, nous avons étudié les combinaisons qui se font normalement quand, à une solution de collagène A, on ajoute soit de l'héparine [3], soit de l'acide chondroïtine-sulfurique [4]. Le lecteur trouvera, dans ces mémoires, la façon dont nous obtenons ces substances. Pour les nouvelles expériences ici rapportées, héparine et A. Ch. S. ont été utilisés à trois doses : forte (H., 0,5 mg ; A. Ch. S.,

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 décembre 1956.

1 mg), *optimum* (H., 0,1 mg ; A. Ch. S., 0,2 mg), *faible* (H., 0,02 mg ; A. Ch. S., 0,1 mg). Rappelons que, par *concentration optimum*, nous désignons la quantité de substance qui, ajoutée à une solution de collagène A, se montre capable de donner un précipité qui contient tout le collagène présent dans le milieu et la majeure partie (sinon la totalité) de la substance en cause.

2° *Polyosides bactériens*. — Ont été retenus : un *lipopolysaccharide* (*endotoxine*) *typhique*, un *polyoside typhique* et un *polyoside staphylococcique*. Sur les combinaisons qu'on peut observer entre chacun de ces principes et le collagène A, nous prions le lecteur de se reporter, cette fois encore, à deux de nos précédents mémoires [5, 6]. Il y verra aussi, consigné, le mode de préparation des principes en question. Nous avons utilisé par ailleurs un *polyoside pneumococcique* (Cx) extrait selon la méthode de Anderson et Mc Carty [7].

Nos polyosides bactériens, comme les mucopolysaccharides, ont été utilisés à trois *doses* : *forte* (Endot. typhique, 5 mg ; Polyos. typhique, 2 mg ; Polyos. staphylococcique, 2 mg ; Polyos. Cx, 1 mg), *optimum* (Endot. typhique, 3 mg ; Polyos. typhique, 1 mg ; Polyos. staphylococcique, 0,50 mg ; Polyos. Cx, 0,50 mg), *faible* (Endot. typhique, 1 mg ; Polyos. typhique, 0,25 mg ; Polyos. staphylococcique, 0,20 mg ; Polyos. Cx, 0,20 mg). Le qualificatif *optimum* est pris en ce cas avec la même signification que ci-dessus.

3° Avant toute expérience, une dose forte, optimum ou faible d'un polyoside bactérien a été ajoutée à une dose forte, optimum ou faible d'héparine ou d'acide chondroïtine-sulfurique et le mélange a été dissous dans 1 ml d'eau distillée ; pH du milieu ajusté dans tous les cas à 4,3 (ce pH est aussi celui de la solution de collagène A).

#### MODE OPÉRATOIRE.

1° A un échantillon de la solution de collagène A est ajoutée, en parties égales, une des solutions définies ci-dessus.

2° Les préparations sont agitées puis conservées pendant trois heures à la température du laboratoire.

3° A ce moment, elles sont examinées. On note s'il y a eu, ou non, précipitation. En cas de précipitation, on estime son importance et on examine l'aspect macroscopique du précipité.

4° Ultérieurement, les précipités formés sont recueillis par centrifugation et ils sont repris par de l'eau acétifiée de pH 4,3.

5° Enfin, ils sont chauffés, pendant trois minutes, à des températures variables (entre 45 et 58°). Est déterminée de la sorte la température de dissolution ou de contraction du précipité.

#### Résultats.

Nous indiquons dans le tableau ci-joint :

a) Les principaux caractères des précipités obtenus *normalement* quand on met en contact, en quantités égales, une solution de collagène A et une solution contenant la *dose précipitante optimum* d'héparine, d'acide chondroïtine-sulfurique, de lipopoly-

saccharide (endotoxine) typhique, enfin des polysides typhique, staphylococcique et pneumococcique (Cx).

b) Ce qui se passe quand on ajoute à une même solution de collagène A un *mélange* de mucopolysaccharide et de polyside bactérien, chacun de ces corps se trouvant dans le mélange à la *dose précipitante optimum*.

La lecture de ce tableau permet de faire les observations suivantes :

TABLEAU. — Caractères des précipités obtenus après addition, à une solution de collagène A, de mucopolysaccharides, de polysides bactériens ou d'un mélange mucopolysaccharide + polyside bactérien (tous ces corps étant utilisés à la dose précipitante optimum).

NATURE DES SUBSTANCES PRÉCIPITANTES UTILISÉES	IMPORTANCE DU PRÉCIPITÉ OBTENU	ASPECT PRÉCIPITÉ OBTENU	ACTION DE LA CHALEUR SUR LE PRÉCIPITÉ	
			Température de contraction	Température de dissolution
Héparine	+++	Fibres longues, agrégées	48°	
Acide chondroïtine-sulfurique	+++	Fibres longues, agrégées	48°	
Lipopolysaccharide (endotoxine) typhique	+++	Fibres très courtes, non agrégées		56°
Polyoside typhique (a)	+++	Fibres mal formées (précipité gélatineux)		52°
Polyoside staphylococcique	+++	Fibres longues, agrégées		54°
Polyoside pneumococcique (Cx)	+++	Fibres courtes, non agrégées		54°
Héparine + lipopolysaccharide (endotoxine) typhique	+++	Fibres courtes, non agrégées		56°
Héparine + polyoside typhique	++	Fibres longues (précipité non gélatineux)	50°	
Héparine + polyoside staphylococcique	(1)			
Héparine + Cx	+++	Fibres longues, agrégées	48°	
Acide chondroïtine-sulfurique + lipopolysaccharide (endotoxine) typhique	+++	Fibres courtes, non agrégées		56°
Acide chondroïtine-sulfurique + polyoside typhique	++	Fibres longues (précipité non gélatineux)	50°	
Acide chondroïtine-sulfurique + polyoside staphylococcique	+++	Fibres longues, agrégées	48°	
Acide chondroïtine-sulfurique + Cx	+++	Fibres longues, agrégées	48°	

(a) Observations faites exceptionnellement, non à pH 4.3, mais à pH 7

I. HÉPARINE. — 1° Le précipité obtenu quand l'héparine se trouve en présence d'*endotoxine typhique* est un précipité collagène-endotoxine typique (il est moins abondant toutefois que normalement) ;

2° En présence du *polyoside typhique*, le précipité formé par l'héparine rappelle le précipité collagène-héparine typique ; il en diffère cependant par sa moindre abondance et la température de contraction ;

3° L'absence de précipitation en présence du *polyoside staphylococcique* est évidemment un fait remarquable ;

4° En présence de *polyoside Cx*, le précipité est du type collagène-héparine.

II. ACIDE CHONDROÏTINE-SULFURIQUE. — 1°-2° Observations analogues aux précédentes en présence de l'endotoxine et du polyoside typhiques ;

3°-4° En présence des polyosides staphylococcique et pneumococcique, le précipité obtenu est un précipité collagène-acide chondroïtine-sulfurique typique.

Ajoutons aux données (essentiels) que nous venons de résumer, les précisions suivantes (fruits de nos observations après usage de différents mélanges).

1° *Mélanges héparine-lipopolysaccharide (endotoxine) typhique.* — Le précipité que l'on obtient quand on ajoute au collagène A un mélange héparine-endotoxine typhique se rapproche de celui obtenu par l'addition d'héparine seule quand on a utilisé (la quantité d'héparine étant optimum) une dose faible d'endotoxine ou (la quantité d'endotoxine étant optimum) une dose forte d'héparine. Jamais, toutefois, les précipités obtenus avec ces mélanges ne sont identiques à un précipité collagène-héparine normal (les fibres formées sont moins longues, la température de contraction est de 50° ( $\neq$  48°), la contraction se fait, non en une seule masse, mais en petits grains.

2° *Mélanges héparine-polyoside typhique.* — Le précipité que l'on obtient en ajoutant au collagène A un mélange héparine-polyoside typhique est identique à celui obtenu par l'addition d'héparine seule quand on utilise (la dose de polyoside typhique étant optimum) une dose forte d'héparine ou quand on utilise (la dose d'héparine étant optimum) une dose faible de polyoside typhique.

3° *Mélanges héparine-polyoside staphylococcique.* — Pour obtenir en ce cas un précipité il faut, soit utiliser (la dose de polyoside étant optimum) une dose faible d'héparine ou, encore (la dose de polyoside étant faible), une dose forte d'héparine. Le précipité qui se forme alors est abondant, il est fait de fibres longues et agrégées et il se contracte à 52°. Il est donc d'un type nouveau.

4° *Mélanges héparine-polyoside pneumococcique.* — Les précipités obtenus sont toujours du type collagène-héparine normal, sauf quand le polyoside Cx a été utilisé à dose forte (la dose d'héparine étant optimum). Dans ce dernier cas, le précipité a l'aspect d'un précipité collagène-héparine, mais il se contracte à 50° au lieu de 48°.

5° *Mélanges A. Ch. S.-endotoxine typhique.* — Le précipité que l'on obtient quand on ajoute au collagène A un mélange A. Ch. S.-endotoxine typhique est un précipité collagène-A. Ch. S. typique quand (la dose d'A. Ch. S. étant optimum) on utilise une dose faible d'endotoxine. Quand on se sert d'une dose forte d'A. Ch. S. (la dose d'endotoxine étant aussi forte), il n'y a pas de précipi-



tation. Si l'on opère avec un mélange, à doses faibles, des deux substances, le précipité qui se forme est d'abondance normale : constitué par des fibres longues, il se dissout partiellement à 56°. Il tient donc, par certains de ses caractères, de l'A. Ch. S. et, par d'autres, de l'endotoxine.

6° *Mélanges A. Ch. S.-polyoside typhique*. — Nos observations, ici, ressemblent, point par point, à celles que nous avons rapportées pour les mélanges héparine-polyoside typhique.

7° *Mélanges A. Ch. S.-polyoside staphylococcique*. — Le précipité formé en présence de ces mélanges est du type collagène-A. Ch. S. quand, la dose d'A. Ch. S. étant optimum, est utilisée une dose forte ou faible de polyoside, quand, en présence d'une dose forte d'A. Ch. S., est utilisée une dose faible de polyoside, quand, enfin, les deux substances ajoutées en mélange sont à dose faible. Si l'on utilise une dose forte d'A. Ch. S. et le polyoside à doses optimum ou faible, pas de précipité. Si l'on utilise une dose faible d'A. Ch. S. et le polyoside à dose optimum, obtention d'un précipité fibrillaire d'abondance normale qui se contracte à 50° ( $\neq$  48°). Si, enfin, on utilise une dose faible d'A. Ch. S. et une dose forte de polyoside, le précipité formé est d'abondance normale, il est fibrillaire et il se dissout à 54°. C'est donc un précipité collagène-polyoside staphylococcique typique.

8° *Mélanges A. Ch. S.-polyoside pneumococcique*. — Observations comparables à celles faites avec les mélanges héparine-polyoside pneumococcique.

### Discussion.

Les combinaisons collagène-mucopolysaccharides (héparine, acide chondroïtine-sulfurique) cessent de se faire normalement *in vitro* quand, dans le milieu, se trouvent également un polyoside bactérien comme l'endotoxine typhique ou les polyosides typhique, staphylococcique et pneumococcique (Cx).

1° *Les combinaisons collagène-héparine* sont les plus troublées, surtout quand, dans le milieu, se trouvent de l'endotoxine typhique ou un polyoside staphylococcique. Parfois, on ne note aucune précipitation. Celle-ci se produit-elle, elle est le plus souvent peu abondante ; encore le précipité formé est-il en général du type collagène-polyoside bactérien (exemple : collagène-endotoxine typhique).

2° *Les combinaisons collagène-acide chondroïtine-sulfurique* sont aussi modifiées par la présence, dans le milieu, de polyosides bactériens. Elles le sont pourtant moins nettement, ce qui étonne un peu, attendu que, d'après nos critères de stabilité (action de la chaleur et du  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ ), elles seraient moins stables

que les combinaisons collagène-héparine. Par ordre d'influence décroissante, il faut ranger ici l'endotoxine typhique, puis les polyosides staphylococcique, typhique, enfin le polyoside pneumococcique.

3° Le polyoside typhique est peu actif. Toutefois, son action se fait sentir sur les combinaisons collagène-héparine ou A. Ch. S. à pH 4,3, c'est-à-dire à un pH où ce polyoside est normalement incapable de précipiter le collagène A [6].

Il résultait de nos expériences antérieures [5, 6] que les combinaisons collagène-endotoxine typhique doivent être rangées (compte tenu de l'influence exercée sur elles par la chaleur et le  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  dilué) parmi les moins stables. Malgré cela, il apparaît que l'endotoxine, mieux encore que les autres polyosides, est à même de troubler la mise en place d'une combinaison collagène-mucopolysaccharide. Pourquoi ? Remarquons au moins que ce principe bactérien possède, en commun avec les mucopolysaccharides, le pouvoir de précipiter le collagène à des pH très acides. Des effets compétitifs de l'ordre de ceux que nous avons étudiés s'exercent peut-être plus aisément quand les deux substances antagonistes sont capables d'agir dans des zones de pH semblables.

Dernier fait enfin qu'il nous semble important de relever : dans quelques cas, la solution de collagène A n'a pas précipité, bien qu'on ait mis à son contact deux substances précipitantes. C'est sans doute que, dans ces cas, les interactions mucopolysaccharides-polyosides bactériens étant particulièrement fortes, aucun de ces corps ne s'est plus trouvé libre pour réagir secondairement avec le collagène (1).

#### RÉSUMÉ.

L'héparine, l'acide chondroïtine-sulfurique, le lipopolysaccharide (endotoxine) typhique, des polyosides typhique, staphylococcique et pneumococcique (Cx), ajoutés *séparément* à une solution de collagène A, peuvent, à certaines concentrations, se combiner avec cette protéine en donnant naissance à un précipité.

On pouvait prévoir que la combinaison serait fortement troublée si ces différents corps, au lieu d'être utilisés séparément, étaient ajoutés au collagène A *en mélange*. C'est effectivement ce qui a lieu. Il s'agit même de *modifications profondes*. Parfois, la précipitation du collagène se trouve inhibée. Quand il y a précipitation, elle est le plus souvent d'un type nouveau, encore inconnu. Des quatre polyosides étudiés, le plus actif est l'*endo-*

(1) Nous remercions Mademoiselle Nicole Briquet, aide-technique, de son concours très précieux.

*toxine typhique*, les moins actifs, les polyosides typhique et pneumococcique.

Des actions compétitives du même ordre s'exercent-elles spontanément dans l'organisme ? Le fait, en principe, n'a rien d'impossible. Il aiderait à comprendre comment des principes bactériens, en troublant la mise en place des liaisons normales collagène-mucopolysaccharides dans la trame conjonctive, pourraient jouer un rôle dans la genèse de certaines « maladies du collagène ».

## SUMMARY

### STUDIES ON COLLAGEN.

#### X. — MODIFICATIONS PRODUCED IN *in vitro* COMBINATIONS OF COLLAGEN-MUCOPOLYSACCHARIDES BY BACTERIAL POLYSACCHARIDES.

When heparin, chondroitin-sulfuric acid, typhoid lipopolysaccharide (endotoxin), typhoid, *Staphylococcus* and *Pneumococcus* polysaccharides are separately added to a collagen A solution, they may, under certain conditions, combine with this protein, giving a precipitate.

It was to be expected that the combination would be profoundly modified if these different substances, instead of being used separately, should be added as a mixture to collagen A. In this case, great modifications are actually observed. Sometimes collagen precipitation is inhibited. When it occurs, it is of a new, still unknown type. Out of the four polysaccharides studied, typhoid endotoxin is the most active, typhoid and *Pneumococcus* polysaccharides the less active.

Do such competitions occur in the body ? It is quite possible. It would then be easier to understand how bacterial substances, by modifying normal links between collagen and mucopolysaccharides in connective tissue, might play a part in the genesis of certain « collagen diseases ».

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] BAZIN (S.) et DELAUNAY (A.). *Revue franç. Gériatol.*, (sous presse).
- [2] NAGEOTTE (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1927, **96**, 828.
- [3] BAZIN (S.) et DELAUNAY (A.). *Sem. Hôpitaux (Pathologie et Biologie)*, 1956, **42**, 335.
- [4] DELAUNAY (A.) et BAZIN (S.). *Bull. Assoc. Diplômés Microbiol. Fac. Pharm. Nancy*, 1956, n° 62, 5.
- [5] DELAUNAY (A.), BAZIN (S.) et HENON (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 258.
- [6] DELAUNAY (A.), BAZIN (S.) et HENON (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **94**, 50.
- [7] ANDERSON (H. C.) et Mc CARTY (M.). *J. exp. Med.*, 1951, **93**, 25.

# ÉTUDE COMPARATIVE DES VIRUS DE LA FIBROMATOSE ET DE LA MYXOMATOSE

## II. — ÉTUDE SÉROLOGIQUE PAR LA MÉTHODE D'OUCHTERLONY

par M.-T. FAYET, C. MACKOWIAK, R. CAMAND et E. LEFTHIERIOTIS (\*).

(Institut Français de la Fièvre Aphleuse, Lyon,  
et Laboratoire de Recherches Vétérinaires, Lyon)

Le problème des rapports antigéniques entre le virus de Sanarelli [1], ou virus de la myxomatose du lapin, et le virus de Shope [2], ou virus de la fibromatose, a préoccupé depuis longtemps de nombreux chercheurs. Les travaux effectués dans ce domaine, tant avec les réactions de précipitation et d'agglutination qu'avec la réaction de fixation du complément, ont apporté des résultats parfois contradictoires. Aussi avons-nous pensé étudier ce sujet en utilisant une autre technique : la méthode d'Ouchterlony [3]. Son application a, depuis quelques années déjà, été étendue à l'étude de plusieurs maladies à virus : grippe [4], peste porcine [5], fièvre aphteuse [6], variole et virus du même groupe [7] auxquels pourraient être rattachés, selon Fenner [8], les virus de la fibromatose et de la myxomatose.

La méthode d'Ouchterlony, dérivée de la méthode de Oudin [9, 10], met en évidence des réactions de précipitation spécifique antigène-anticorps par diffusion double en milieu gélifié. Il est admis qu'il existe au moins autant de systèmes antigène-anticorps qu'il y a de franges de précipitation formées au cours de la réaction (Burtin [11]). D'autre part, dans des conditions déterminées, lorsqu'un même sérum est mis en présence de plusieurs solutions antigéniques ou inversement plusieurs sérums mis en présence d'un même antigène, les lignes de précipitation peuvent soit se raccorder, indiquant qu'il s'agit d'un même système antigène-anticorps [12, 13, 14], soit se croiser sans s'influencer.

Nous envisagerons successivement l'obtention des éléments de la réaction, la technique utilisée, et les résultats que nous discuterons.

### I. — OBTENTION DES RÉACTIFS.

A. ANTIGÈNES. — 1° *Antigènes fibromatose et myxomatose.* — Ces antigènes sont préparés de la même façon à partir de souches

(\*) Manuscrit reçu le 14 novembre 1956.



de fibromes et de myxomes conservées au congélateur, en glycérine à 50 p. 100. 1 g de tissu est lavé avec du tampon phosphate (pH = 7,6 ;  $\mu$  = 0,15), broyé avec du quartz et repris dans 10 ml de tampon phosphate. Après centrifugation à 1 500 *g* pendant cinq minutes, le surnageant est conservé au réfrigérateur.

Dans le but de les concentrer, les antigènes ont été :

Soit dialysés contre une solution de saccharose dans le tampon phosphate ;

Soit dialysés contre la glycérine.

Ces deux procédés de dialyse ont permis de concentrer cinq à dix fois les antigènes. Sans nuire à la réaction, le saccharose rendant la solution visqueuse, il est préférable de l'éliminer en partie par des dialyses successives contre une solution de saccharose dans le tampon et contre le tampon seul. La glycérine présente l'inconvénient d'absorber l'eau de la gélose, et les cupules ont alors tendance à déborder.

2° *Antigènes témoins*. — Ces antigènes sont obtenus à partir du derme du dos de lapin normal, préparés et concentrés de la même façon que les antigènes myxomatose et fibromatose.

B. SÉRUMS. — 1° *Sérums anti-fibromatose et anti-myxomatose*. — Ces sérums sont obtenus, d'une part sur des lapins hyper-immunisés contre l'un ou l'autre virus (nous n'avons pu disposer pour la myxomatose que d'un seul lapin guéri spontanément d'infection naturelle), d'autre part sur des lapins en pleine évolution de la maladie et souvent près de l'agonie.

2° *Sérums témoins*. — Ils sont représentés par un sérum *anti-derme* préparé sur lapin par inoculations répétées d'une suspension de derme de lapin normal, et par les *sérums normaux* prélevés sur chaque lapin avant toute intervention.

## II. — TECHNIQUE.

La technique employée dérive de celle décrite par Bjorklund [45] et reprise par Wilson et Pringle [46].

1° *Opérations*. — Le gel de gélose contient :

1,5 p. 100 d'agar-agar ;

100 mg/l de merthiolate ;

20 mg/l de méthylorange.

Après chauffage à 120°, la gélose est filtrée et son pH ajusté à 7,5 avec du carbonate de sodium. Elle est coulée dans des boîtes de Petri en couche de 3 à 4 mm, et des trous ronds de 12 mm de diamètre, distants de 12 mm, sont pratiqués à l'emporte-pièce ; au fond de chaque cupule ainsi ménagée, on coule une mince couche de gélose.

Antigènes et sérums sont distribués à raison de 0,2 ml par

cupule une fois par jour pendant trois jours. Les boîtes sont alors placées à l'étuve à 37° pendant deux ou trois jours puis laissées à température ordinaire.

2° *Lecture*. — Les boîtes sont observées quotidiennement par éclairage oblique sur fond noir. La positivité de la réaction se traduit par l'apparition après vingt-quatre à quarante-huit heures d'une ou plusieurs franges de précipitation qui se développent ensuite pour atteindre un maximum vers le huitième ou le dixième jour. Dans chaque cas, nous conviendrons d'appeler « première frange », celle qui est la plus proche du sérum.

Pour la clarté de notre exposé, nous avons adopté une notation arbitraire en croix, une réaction très fortement positive étant indiquée par quatre croix. Toutefois, cette notation est insuffisante pour exprimer complètement l'allure de la réaction ; il faut, en effet, tenir compte de l'emplacement des franges et de leur conformation respective suivant qu'elles sont courtes ou longues, fines ou floues.

### III. — RÉSULTATS.

Trois séries de réactions ont été réalisées :

1° Réactions homologues entre antigènes et sérums correspondants ;

2° Réactions croisées entre fibromatose et myxomatose ;

3° Réactions témoins, d'une part, avec les antigènes de derme de lapin normal en présence de sérum anti-fibromatose et anti-myxomatose, d'autre part, avec les sérums antidermes et les sérums normaux en présence des antigènes virulents.

Dans ces réactions ont été utilisés les antigènes concentrés cinq à dix fois par dialyse, de préférence aux antigènes non concentrés qui donnent des franges moins visibles. Ces antigènes ont été mis en présence soit de sérum d'animaux en pleine maladie, soit de sérum d'animaux hyperimmunisés.

1° *Sérums d'animaux en pleine maladie*. — Ils donnent quelques résultats positifs dans le cas de la fibromatose, mais jamais dans le cas de la myxomatose.

2° *Sérums d'animaux hyperimmunisés*. — Les résultats obtenus dans ce cas sont illustrés par la figure 1 et exprimés d'une façon schématique dans le tableau I où il n'est pas fait mention des réactions témoins toutes négatives.

Photographie et tableau mettent en évidence la réaction particulièrement forte de l'antigène myxomatose avec le sérum homologue en comparaison avec la réaction plus faible entre antigène fibromatose et sérum correspondant. La même différence d'intensité s'observe dans les réactions croisées en faveur de l'antigène myxomatose.

En outre, il est intéressant de noter le raccordement des lignes

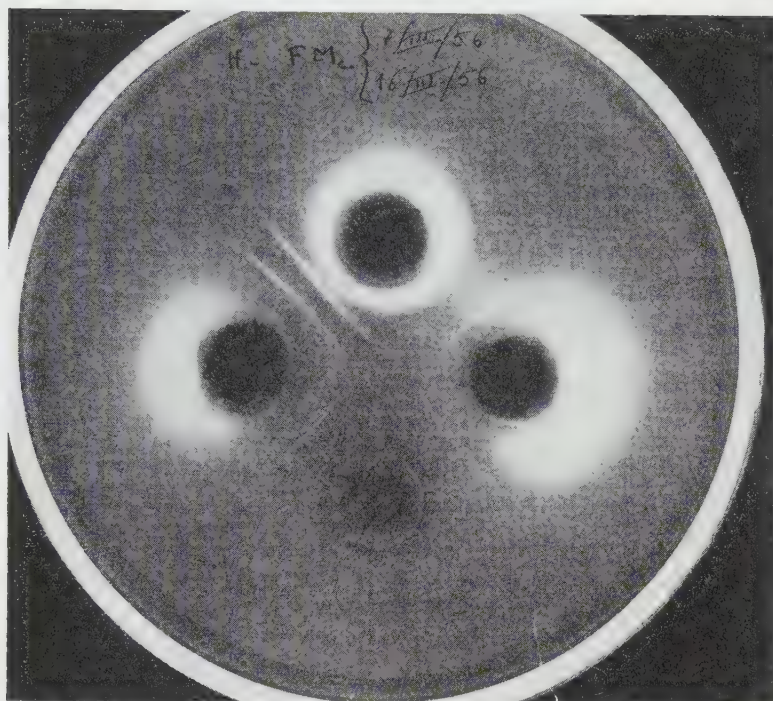


FIG. 1. — Résultats des réactions homologues et croisées.

Ag M. Antigène myxomatose concentré. — Ag F. : Antigène fibromatose concentré.  
 Sér. M : sérum anti-myxomatose. — Sér. F : sérum anti-fibromatose.

TABLEAU I. — Résultats des réactions.

Antigène	Sérum	Frange 1	Frange 2	Frange 3	Caractères des franges.
Ag Myxomatose	sérum anti M.	++++	+++	0	Les deux franges sont toujours nettes.
	sérum anti-F.	+++	++	+	Netteté diminuée de la 1ère à la 3ème.
Ag Fibromatose	sérum anti F.	+++	+	0	1ère frange : fine et longue 2ème frange : irrégulière, courte et floue, près de l'antigène.
	sérum anti M.	+++	0	0	Frange fine, nette, assez longue.

Ag = antigène. — Sérum anti M. = sérum anti-myxomatose.  
 Sérum anti F. = sérum anti-fibromatose.

de précipitation entre elles dont la présence, on le sait, traduit l'identité des systèmes antigène-anticorps. Le schéma donné illustre ces faits où l'on peut remarquer :

1° Que la frange entre antigène fibromatose et sérum anti-myxomatose se raccorde avec la première frange entre antigène myxomatose et sérum anti-myxomatose (schéma : ligne 1).

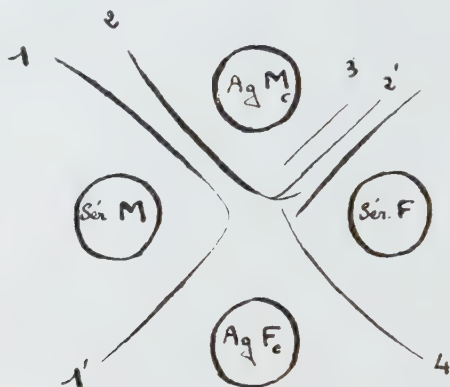


Schéma des lignes obtenues.

2° Qu'il semble y avoir coalescence partielle entre la deuxième frange séparant l'antigène myxomatose et le sérum anti-myxomatose et la deuxième frange séparant l'antigène myxomatose et le sérum anti-fibromatose (schéma : ligne 2).

#### DISCUSSION.

L'analyse des résultats précédents découvre la complexité des relations entre le virus de la fibromatose et de la myxomatose. Effectivement, les interprétations peuvent s'établir en fonction de l'absence ou de l'existence plus ou moins apparente de lignes de précipitation d'une part, et de l'absence ou de l'existence de raccordement entre certaines de ces lignes d'autre part.

Alors que le virus de la myxomatose provoque avec les sérums d'animaux hyperimmunisés contre l'une ou l'autre maladie des franges de précipitation sensiblement plus fortes que celles données par le virus de la fibromatose, le sérum d'animaux en pleine évolution de myxomatose ne donne aucune frange de précipitation.

Cette supériorité antigénique du virus de la myxomatose, mise en évidence par les réactions des sérums hyperimmuns, liée à la faiblesse de la réponse en anticorps au cours d'une infection due à ce virus particulièrement agressif, pose un problème complexe



qui incite à le considérer comme un « antigène fort » et un « immunigène faible ».

Quant à l'étude du raccordement des lignes, elle permet de supposer l'existence d'une certaine communauté antigénique entre les deux virus.

Le fait pour le sérum anti-myxomatose de donner avec chacun des deux antigènes une ligne de précipitation qui se raccorde à l'autre (schéma : ligne 1) conduit à penser que les antigènes myxomatose et fibromatose doivent comporter une partie commune.

De la même façon, la coalescence partielle entre les deuxièmes lignes de précipitation formées avec l'antigène myxomatose et les sérums anti-myxomatose et anti-fibromatose parle en faveur de l'existence dans les deux sérums, d'une fraction anticorps commune.

Par contre, l'antigène fibromatose semble détenir une fraction antigénique propre, puisqu'il donne avec le sérum anti-fibromatose une ligne de précipitation (ligne 4) ne se raccordant à aucune autre.

#### RÉSUMÉ.

La méthode d'Ouchterlony a pu être appliquée à l'étude du virus de la myxomatose et de la fibromatose. Il est permis de considérer cette méthode comme un moyen d'étude intéressant, tant du point de vue dogmatique que pratique, sur les rapports antigéniques et immunologiques des virus de Shope et de Sanarelli.

#### SUMMARY

COMPARATIVE STUDY OF FIBROMATOSIS AND MYXOMATOSIS VIRUSES.

##### I. SEROLOGICAL STUDY BY OUCHTERLONY'S METHOD.

Ouchterlony's method has been applied to the study of myxomatosis and fibromatosis viruses. This method has proved effective in the study, from the theoretical as well as from the practical point of view, of the antigenic and immunologic relationships between Shope's and Sanarelli's viruses.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] SANARELLI (G.). *Zentralbl. Bakt. I Orig.*, 1898, **23**, 865.
- [2] SHOPE (R. E.). *J. exp. Med.*, 1932, **56**, 793.
- [3] OUCHTERLONY (O.). *Thèse*, Stockholm, 1945.
- [4] JENSEN (K. E.), FRANCIS (T. J.). *J. Immunol.*, 1953, **70**, 321.
- [5] MOLNAR (I.). *Acta Veter.*, 1954, **4**, 247.

- [6] BODON (L.). *Acta Veter. Acad. Sci. Hung.*, 1955, **5**, 157.
- [7] GISPEN (R.). *J. Immunol.*, 1955, **74**, 134.
- [8] FENNER (Fr.). *Nature*, 1953, **171**, 562.
- [9] OUDIN (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1946, **222**, 113.
- [10] OUDIN (J.). *Methods in medical Research*, Year Book, Chicago, 1952, **5**, 335.
- [11] BURTIN (P.). *Rev. int. Hépatol.*, 1954, **8-9**, 641.
- [12] WILSON (M. W.) et PRINGLE (B. H.). *J. Immunol.*, 1955, **75**, 460.
- [13] OUDIN (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 531.
- [14] OUCHTERLONY (O.). *Acta path. microbiol. scand.*, 1953, **32**, 231.
- [15] BJORKLUND (B.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1954, **85**, 438.
- [16] WILSON (M. W.) et PRINGLE (B. H.). *J. Immunol.*, 1954, **73**, 232.

**ISOLEMENT DE LA GORGE D'UN ENFANT  
D'UNE  
SOUCHE VIRULENTE DE VIRUS POLIOMYÉLITIQUE  
SANS PRÉSENCE D'ANTICORPS HOMOLOGUES**

par M<sup>me</sup> M.-C. CARRÉ (\*).  
[avec la collaboration de L. CHAUMONT]

(*Institut Pasteur, Service des Virus* [D<sup>r</sup> P. LÉPINE])

On connaît la dispersion extrême du virus poliomyélitique dans la nature et la fréquence avec laquelle on l'isole des selles et des voies respiratoires, même de sujets apparemment sains.

Le but de notre étude n'est donc pas de rapporter un tel isolement, mais de souligner deux particularités :

D'une part la présence de virus dans la gorge d'un enfant atteint d'une ataxie aiguë avec fièvre, ayant guéri en quelques jours.

D'autre part l'absence d'anticorps dans le sérum de cet enfant, alors que la souche s'est montrée extrêmement virulente pour le singe.

C'est en décembre 1955 que nous furent apportés par le D<sup>r</sup> Chany deux prélèvements, l'un des sécrétions pharyngées, l'autre du L. C.-R. d'un enfant de 8 ans, hospitalisé dans le service du professeur agrégé Joseph à l'hôpital des Enfants-Malades. Cet enfant présentait depuis deux jours un syndrome ataxique à début brutal dont l'origine était mal définie. L'histoire de la maladie et son évolution sont les suivantes.

La maladie a débuté une semaine plus tôt, le 29 novembre, par une sensation d'instabilité. Du 30 novembre au 2 décembre, la température a oscillé entre 38° et 39° ; elle revient à 37° le 2 décembre et reste normale après cette date. L'enfant a été alité du 30 novembre au 2 décembre et ne s'est plaint que de légères céphalées ; aucun signe anormal n'a été constaté à ce moment et il n'a reçu d'autre traitement que de l'aspirine, de la codéine et de la phénothiazine à doses modérées.

Le 2 décembre, l'enfant se lève, sa démarche est instable,

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 décembre 1956.

ébrieuse. Le 3, les troubles de la marche et de l'équilibre s'accroissent, les céphalées sont plus vives, un tremblement intentionnel des membres supérieurs apparaît. Le 4 décembre, la marche est impossible, la dysmétrie et l'adiadococinésie sont très accentuées et généralisées, la parole est scandée. Il existe une hypotonie globale, sans paralysie ni parésie. La température reste normale.

Le 6 décembre, l'enfant est apyrétique, avec une céphalée légère. Le syndrome cérébelleux est encore évident, avec hypotonie, troubles de l'équilibre et de la coordination, dysmétrie, nystagmus; il est cependant moins intense et le tremblement a cessé. Du 6 au 11 décembre, le syndrome cérébelleux diminue et disparaît complètement; les examens ultérieurs (février et mai 1956) n'ont plus montré de signes anormaux. A aucun moment de l'évolution l'enfant n'a présenté de paralysies, de troubles sensitifs ou sphinctériens, d'atteinte des paires crâniennes.

*Examens* : P. L. (6 décembre 1955), liquide clair; cytologie, 0,8 éléments/mm<sup>3</sup>; albumine, 0,20/1 000 g; glucose, 0,56/1 000 g.

Hémogramme (6 décembre 1955) : 4 500 000 G. R.; Hb, 85 p. 100; 2 400 G. B. (polynucléaires neutrophiles, 36 p. 100; éosinophiles, 2 p. 100; lymphocytes, 26 p. 100; grands lymphocytes, 23 p. 100; monocytes, 14 p. 100; plasmocytes, 1 p. 100).

Ophthalmoscopie (6 décembre 1955), fonds d'yeux normaux.

Radiographies du crâne (6 décembre 1955), normales.

Electrophorèse du sérum (15 mai 1956), fractions albuminiques et globuliniques normales.

Electro-encéphalogramme (6 décembre 1955) : nombreuses ondes lentes, en bouffées postérieures bilatérales, non modifiées par l'hyperpnée et la stimulation lumineuse. Ces anomalies ont disparu sur les tracés enregistrés le 26 décembre 1955 et le 20 février 1956.

*En résumé*, cet enfant de 10 ans a présenté une affection aiguë avec fièvre et céphalée légères pendant quatre jours. Au décours de cette période fébrile, il a présenté une ataxie cérébelleuse globale, importante et isolée, qui a régressé spontanément en moins de dix jours. Le liquide rachidien est resté normal. Aucune atteinte spinale ou bulbo-protubérantielle n'a été constatée. Des anomalies transitoires de l'électro-encéphalogramme ont accompagné l'ataxie.

Des travaux ont été effectués au laboratoire, dans le but de savoir si un virus pouvait être incriminé et lequel.

Notre étude a été conduite en trois étapes :

1° *Isolement et caractérisation du virus.*

2° *Recherche des anticorps dans le sérum.*

3° *Inoculation aux animaux pour s'assurer de la virulence in vivo.*



1° **ISOLEMENT DU VIRUS.** — Il a été réalisé sur cellules de rein de singe. Six passages ont été effectués entre le 14 décembre 1955 et le 10 janvier 1956. Le premier de ces passages montrait, à partir du quatrième jour, une détérioration progressive de la culture, sans qu'on puisse affirmer la spécificité des lésions ; au huitième jour, à côté de zones entièrement détruites, persistaient des plages cellulaires intactes. Un deuxième, puis un troisième passage étaient alors réalisés ; au bout de six jours, la culture était lysée. Les lésions apparurent en deux jours au quatrième passage ; par la suite, en vingt-quatre à quarante-huit heures, la détérioration était complète.

Des passages ont été réalisés également sur cellules HeLa, qui se sont montrées sensibles au virus, les lésions se manifestant cependant un peu plus lentement que sur les cellules de singe. Par contre, les essais d'isolement à partir du liquide céphalo-rachidien ont tous échoué, aussi bien sur un type cellulaire que sur l'autre.

Au cours de ces transferts successifs, le diagnostic de virus de type poliomyélitique s'était précisé de plus en plus, l'aspect des lésions semblant assez caractéristique. Dans le but de confirmer cette hypothèse, deux opérations ont été menées simultanément : d'une part, l'ensemencement sur des tubes à lamelles, destinés à être fixés et colorés ; d'autre part, des essais de neutralisation par des sérums de lapin spécifiques des trois types de virus.

A. *Les lésions* : Leur progression a pu être suivie par la fixation et la coloration, à intervalles réguliers, des lamelles de verre supportant la culture cellulaire infectée par le virus. La coloration utilisée est l'hémalum-éosine.

On a pu observer de cette façon au microscope des modifications rappelant exactement les lésions provoquées par le virus poliomyélitique : augmentation légère du volume de la cellule qui s'arrondit, devient irrégulière ; apparition dans le cytoplasme d'une masse éosinophile, au voisinage du noyau ; le contour de cette masse se précise de plus en plus, le noyau est repoussé à la périphérie ; il présente des altérations, sa membrane se plisse, les nucléoles se déforment tout en restant fortement basophiles. Par la suite, tandis que la colorabilité de la masse centrale diminue, le cytoplasme disparaît entièrement et il ne reste plus qu'un noyau rétracté, lequel, à son tour, subit une lyse totale.

B. *Titrage* : Le titre de notre matériel virulent, recherché suivant la technique habituelle, s'est révélé assez élevé : une dose infectante 50 p. 100 pour la dilution de  $10^{-7}$ .

C. *Neutralisation* : Réalisée avec chacun des trois sérums spécifiques de la poliomyélite, elle a donné les résultats suivants : inhibition complète de l'effet cytopathogène avec le sérum type I ;

aucune inhibition avec les sérums de type II et III. Il s'agissait donc d'un type I.

2° RECHERCHE DES ANTICORPS DANS LE SÉRUM DU MALADE. — Une fois établi le diagnostic de virus poliomyélitique, restait à savoir s'il pouvait être mis en cause dans le syndrome ataxique au cours duquel il avait été isolé. Pour cela, nous possédions un échantillon de sérum de l'enfant, prélevé au moment de la maladie, et un échantillon prélevé trois mois plus tard. La comparaison des taux d'anticorps vis-à-vis du virus incriminé dans chacun de ces échantillons permettait de relever : ou une élévation sensible du titre, fait très en faveur d'une correspondance entre le syndrome pathologique et l'agent viral isolé, ou aucune élévation, constatation ne permettant pas de considérer le virus comme l'agent causal de la maladie. Or, à notre grande surprise, non seulement il n'y avait aucune élévation du titre en anticorps, mais même le premier échantillon de sérum n'en renfermait pas du tout. Les titrages furent recommencés à plusieurs reprises, mettant en présence les sérums, avec notre matériel virulent isolé d'une part, et avec une souche type I de virus poliomyélitique d'autre part ; les résultats furent entièrement négatifs ; le sérum de l'enfant ne renfermait aucun anticorps de ce type. Par contre, il neutralisait le type III jusqu'au 1/32 dans le premier et le deuxième prélèvement.

Il paraissait alors étonnant que cet enfant pût héberger un virus poliomyélitique sans présenter d'immunité vis-à-vis de ce virus, et sans que ce dernier provoque chez lui aucun trouble grave, puisque cette ataxie aiguë avait guéri spontanément en quelques jours, en admettant qu'il faille voir en elle un désordre causé par le virus. On était ainsi amené à penser qu'il s'agissait peut être d'une souche non virulente, *in vivo* tout au moins, puisque la virulence avait déjà été mise en évidence *in vitro* sur culture de tissus. C'est pourquoi nous avons procédé par la suite à des inoculations aux animaux : souris, singe, lapin, afin d'apprécier à la fois le pouvoir pathogène et le pouvoir antigène.

3° INOCULATIONS. — Elles ont été pratiquées sur des souris adultes, des souriceaux de quarante-huit heures, des souriceaux de douze jours, par voie intrapéritonéale, intracérébrale, intramédullaire. Les animaux sont toujours restés indemnes. Une fois seulement, sur 8 souriceaux inoculés par voie médullaire, 3 sont morts au bout de huit jours. Des prélèvements effectués sur la moelle et le cerveau ne montrèrent aucune lésion à l'examen histologique ; les passages de ces organes sur cellules de rein de singe restèrent entièrement négatifs.

Un singe cynocéphale fut alors inoculé par voie intracérébrale.

Il développa, au bout de six jours, un syndrome encéphalitique avec hypotonie, tremblement, incoordination motrice. L'existence de paralysies n'a pu être mise en évidence. L'animal, à l'agonie, fut sacrifié le huitième jour et les organes prélevés pour mise en culture de tissus et examen anatomique.

A. *L'examen des coupes de cerveau et de moelle* a montré l'existence d'altérations typiques de poliomyélite avec infiltration leucocytaire, manchons périvasculaires, lésions de neuronophagie.

B. *Réisolement du virus* : Réalisé par broyage de petits fragments de cerveau, cervelet, moelle, centrifugation et introduction de quelques gouttes du surnageant dans des tubes neufs de cellules rénales de singe.

A partir de la moelle et du cervelet, aucun effet cytopathogène ne fut retrouvé. Par contre, à partir du cerveau, on pouvait obtenir le deuxième jour un début de désagrégation de la culture avec des altérations cellulaires de type poliomyélitique et une destruction complète en quatre jours. Au deuxième passage, la destruction était totale en vingt-quatre heures. Le troisième passage était réalisé sur des tubes à lamelles ; celles-ci, fixées et colorées au moment du maximum des lésions, montraient à l'examen microscopique la présence de masses éosinophiles typiques à l'intérieur des cellules, par ailleurs déformées et en voie de lyse. Il n'a pas été constaté chez le singe d'augmentation significative du taux des anticorps neutralisants, mais la rapidité d'évolution du syndrome, en moins de dix jours, n'a pas laissé à ceux-ci le temps de se constituer.

La preuve du pouvoir antigénique de la souche, enfin, a été apportée par les essais d'immunisation pratiqués chez le lapin. Deux animaux ont reçu chacun trois injections intramusculaires de 5 ml de matériel virulent ; leur sérum a été mis en présence, à dilutions croissantes, à la fois du virus qui leur avait été inoculé et de la souche MAH de poliomyélite. L'une et l'autre souche ont été neutralisées par les sérums de ces lapins, le premier jusqu'au 1/128, le second jusqu'au 1/512.

#### DISCUSSION.

*En résumé*, il a été isolé dans la gorge d'un enfant de 8 ans atteint d'un syndrome ataxique d'allure aiguë un virus poliomyélitique de type I, doué de pouvoir pathogène *in vivo* et *in vitro* et de pouvoir antigène. Le sérum de l'enfant, à aucun moment, n'a renfermé d'anticorps vis-à-vis de ce type ; cet enfant n'était pas atteint d'agamma-globulinémie ; il possédait d'ailleurs des anticorps pour un autre type du virus poliomyélitique (III).

Du fait qu'on n'a pas observé d'élévation du titre en anticorps du sérum parallèlement à l'évolution de la maladie, il

est impossible de dire si le virus isolé peut ou non en être la cause. Il est possible qu'il ait été présent dans les voies respiratoires depuis un certain temps et que son isolement n'ait été réalisé qu'à l'occasion du syndrome clinique, et comme un épiphénomène. L'absence de syndrome cérébelleux au cours de poliomyélites cliniquement certaines, de type spinal, mésencéphalique ou méningé, fait retenir assez aisément cette hypothèse. Mais il est alors extrêmement difficile d'expliquer comment une souche pathogène pouvait subsister sans provoquer de désordres chez un sujet ne présentant apparemment aucune immunité. Il ne semble pas que de tels faits aient déjà été signalés. Miller et Lenahan [4], étudiant 51 sérums de sujets ayant été en contact avec des malades et dont la moitié étaient porteurs de virus, en ont trouvé un entièrement dépourvu d'anticorps contre le virus homologue. Mais il faut remarquer que le test de neutralisation qu'ils ont utilisé, fondé sur la variation du pH du milieu, n'est pas dépourvu de causes d'erreurs, ainsi qu'eux-mêmes, d'ailleurs, le notent. Les études épidémiologiques démontrent que c'est précisément chez les individus ne possédant pas d'anticorps que se déclare et se propage l'infection. Cela ressort fort bien des constatations effectuées par de nombreux auteurs et résumées par P. Lépine lors de la III<sup>e</sup> Conférence internationale de la poliomyélite [2].

L'hypothèse d'une disparition des anticorps avec persistance de l'immunité ne peut être retenue ; lorsque le titre s'élève au cours d'une atteinte par le virus, ce titre demeure élevé pendant un temps fort long, de l'ordre de plusieurs mois à plusieurs années [3, 4, 5, 6]. Si donc l'enfant dont nous avons étudié le sérum avait eu des anticorps, ceux-ci auraient été détectés, au moins dans le deuxième échantillon prélevé au bout de trois mois.

Peut-on envisager ici des phénomènes d'immunité croisée ? Un individu peut se montrer réfractaire à une atteinte microbienne ou virale s'il possède des anticorps pour un autre type d'agent infectieux ayant avec le premier des affinités antigéniques. On a trouvé, de fait, chez cet enfant, des anticorps pour le type III jusqu'au 1/32. Mais, outre que ce taux semble assez faible étant donné qu'il s'agit là d'une infection récente, il n'existe apparemment aucune immunité croisée entre les trois types de virus poliomyélitique [7, 8]. De là découle la nécessité d'une vaccination triple par mélange des trois souches dans les lots de vaccin. Certaines relations entre les types I et II ont été notées cependant par de nombreux auteurs étudiant le développement des anticorps neutralisant la souche Lansing au cours d'épidémies dues à la souche I. Ces anticorps hétérotypiques peuvent atteindre des titres élevés et persister plusieurs années, tout au moins chez les sujets ayant fait une forme inapparente ; chez les malades,



en effet, Sabin [9] ne les trouve plus après trois mois ; de même Clark et Rhodes [10], Pavilanis et Frappier [4]. Ces faits rendent possible la détermination de l'état d'immunité d'une population vis-à-vis du type I, d'après la courbe des anticorps du type Lansing. Mais tel n'est pas le cas dans notre étude, puisque les seuls anticorps sériques existant étaient du type III, et que, jusqu'à présent, aucune relation n'a été signalée entre ce type et le type I.

Toutes ces constatations nous amènent à penser que l'appréciation du degré de protection d'un individu vis-à-vis d'un agent viral d'après l'étude de son sérum seul n'est pas un critère absolu ; l'immunité tissulaire est d'une importance très grande dans les processus de défense de l'organisme. Les anticorps sériques ne sont qu'un témoin du degré de protection du sujet, témoin presque toujours présent et qu'il est commode de rechercher. Peut-être faut-il voir dans le cas que nous venons de rapporter un exemple où manque le témoin ?

Nous adressons tous nos remerciements à M. le professeur agrégé Joseph et au Dr Job, assistant des Hôpitaux, pour leurs encouragements et leurs conseils, ainsi qu'au Dr Chany qui nous a aidée dans cette étude.

## SUMMARY

ISOLATION FROM A CHILD'S PHARYNX OF A VIRULENT  
STRAIN OF POLIOMYELITIS VIRUS,  
HOMOLOGOUS ANTIBODIES BEING ABSENT IN THE CHILD'S SERUM.

A poliomyelitis virus type 1, antigenic and pathogenic *in vivo* and *in vitro*, has been isolated from the pharynx of a child showing an acute ataxic syndrome.

The child has never possessed serum antibodies for this virus type, although he certainly was in a state of resistance, since the clinical syndrome disappeared spontaneously.

The possible existence of a crossed immunity, or of a tissular immunity is discussed.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] MILLER (C. A.) et LENAHER (M. F.). *Pediatrics*, 1956, **17**, 489.
- [2] *Third international poliomyelitis conference*, Rome, 6-10 Septembre 1954.
- [3] PAUL (J. R.) et RIORDAN (J. T.). *Amer. J. Hyg.*, 1950, **52**, 202.

- [4] PAVILANIS (S. V.) et FRAPPIER (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **85**, 690.
- [5] MILLER (C. A.) et WENNER (H. A.). *Pediatrics*, 1954, **14**, 573.
- [6] STEIGMAN (A. J.) et SABIN (A. B.). *J. exp. Med.*, 1949, **90**, 349.
- [7] LÉPINE (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1953, **147**, 1323.
- [8] *Second international poliomyelitis conference*, Philadelphie, Lip-pincot, édit., 1952, p. 419.
- [9] SABIN (A. B.). *J. exp. Med.*, 1952, **96**, 99.
- [10] CLARK (E. M.) et RHODES (A. J.). *Canad. J. med. Sci.*, 1951, **29**, 216.

## CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU VIRUS SPUMEUX (*FOAMY VIRUS*)

### II. — ÉTUDE DES LÉSIONS DES CELLULES RÉNALES SIMIENNES ET HUMAINES, DES CELLULES TESTICULAIRES SIMIENNES ET DES CELLULES CANCÉREUSES HELA, CAUSÉES PAR LE VIRUS SPUMEUX (SOUCHE FV I, FV II ET FV III)

par M. PACCAUD (\*) (\*\*).

(*Institut Pasteur. Service des Virus* [D<sup>r</sup> P. LÉPINE])

Dans la première partie de cette étude, nous avons brièvement décrit l'aspect des lésions cellulaires dues aux souches virales que nous avons isolées.

Ces lésions ne sont pas cependant d'un type particulier à ce virus, puisque jusqu'à présent deux autres virus, le virus rougeoleux [2] et le virus des oreillons [3, 4], provoquent également l'apparition d'énormes cellules géantes multinucléées dans les cultures de cellules épithéliales humaines ou simiennes.

Nous avons donc entrepris l'étude des lésions dues au virus spumeux, d'une part, par l'observation des lésions à l'état frais et, d'autre part, en effectuant diverses colorations des cultures cellulaires, infectées soit spontanément, soit par nos souches.

Les cellules, cultivées selon les méthodes décrites dans la première partie de cet article, prolifèrent sur des lamelles de verre contenues dans des tubes aplatis [1]. En temps opportun, après deux lavages avec de la solution de Hanks pour éviter des précipitations d'albumines dues aux fixateurs, les cultures sont fixées avec de la liqueur de Bouin ou du formol, selon les colorations désirées, et sont colorées directement dans les tubes. Ce n'est qu'après déshydratation que les lamelles sont retirées des tubes et montées sur lames.

#### LÉSIONS PRÉSENTÉES PAR LES CELLULES RÉNALES SIMIENNES ET HUMAINES.

Qu'elles soient d'origine humaine ou simienne, les cultures de cellules infectées par le virus spumeux réagissent essentiellement

(\*) Boursier de la Fondation Darré.

(\*\*) Manuscrit reçu le 6 novembre 1956.

de la même façon, par l'apparition de cellules géantes multinucléées à type plasmoidal ou syncytial.

Cependant, les fibrocytes sont atteints avant les cellules épithéliales ; ces cellules apparaissent sous une forme contractée, granuleuse. Colorées à l'hémalum-éosine, le cytoplasme est fortement et uniformément éosinophile ; le noyau, contracté, très basophile, a perdu sa structure fine et son nucléole. Nous n'avons quasiment pas observé de pycnose nette du noyau, la cellule à ce stade n'étant plus fixée sur le verre (V. 1<sup>er</sup> mém., pl. II, fig. 5). Enfin, nous n'avons jamais vu dans ces cellules d'inclusion quelconque, cytoplasmique ou nucléaire.

Dès le sixième jour de l'infection, des cellules plurinucléées, aux limites floues, apparaissent sur les bords des colonies de cellules épithéliales ; elles augmentent rapidement de taille et, surtout dans les cultures de cellules de singe, leur cytoplasme devient multivacuolé à tel point qu'il ne paraît plus être formé que de vacuoles, ou même de bulles, optiquement vides.

Coloré à l'hémalum-éosine, le cytoplasme, sauf aux alentours des amas nucléaires, est très pâle, par suite de sa très faible épaisseur. Les noyaux, régulièrement ovoïdes et serrés les uns contre les autres, en ligne ou en amas, ne diffèrent généralement pas des noyaux de cellules normales, sinon par leur moindre basophilie. Parfois leur chromatine est grossière, mais sans qu'il y ait atteinte du nucléole.

Nous n'avons noté aucune inclusion nucléaire et *jamais* nous n'avons observé de mitose dans ces plasmodes.

Les vacuoles ou bulles cytoplasmiques frappent par leur nombre, leur taille, leurs limites très nettes, comme formées de petits corpuscules fortement éosinophiles. Ces vacuoles ne se colorent ni par le Soudan III, ni par le mucicarmin (1<sup>er</sup> mém., pl. II, fig. 7).

On observe fréquemment des inclusions cytoplasmiques éosinophiles dans les cellules rénales colorées à l'hémalum-éosine ; ces inclusions n'ont néanmoins aucune signification pathologique en ce qui concerne le virus spumeux, car on les observe également dans les cultures témoins non infectées.

Par contre, nous avons noté dans les cultures infectées, aussi bien humaines que simiennes, ne contenant que quelques plasmodes, un certain nombre de cellules présentant des granulations cytoplasmiques extrêmement basophiles, en plus ou moins grand nombre et de taille très diverses (1<sup>er</sup> mém., pl. II, fig. 8). Ces granulations peuvent avoir un aspect très homogène et sans structure ou celui d'une inclusion vacuolaire. Nous avons été frappés par le fait que ces granulations se trouvent dans des cellules « intactes », groupées en amas, dans des cellules plurinucléées, trop petites encore pour être considérées comme des



plasmodes, ou dans des cellules à la périphérie des plasmodes, mais par contre très rarement dans ceux-ci.

Nous n'avons pas rencontré de telles formations dans les cultures témoins de cellules rénales humaines.

Si, après traitement à l'hémalun, on pousse la décoloration du noyau cellulaire par le jaune de méthanil, ces corpuscules restent encore fortement basophiles, et après coloration au Feulgen, ils se révèlent comme ne contenant pas d'acide désoxyribonucléique. Nous pouvons donc déduire de ceci que ces granulations ne sont pas de nature nucléaire.

#### LÉSIONS PRÉSENTÉES PAR LES CELLULES CANCÉREUSES HeLa.

Le virus spumeux provoquant également l'apparition de cellules géantes plurinucléées dans les cultures de cellules HeLa, nous rappelons ici, que, pour éviter toute confusion avec les cellules géantes rencontrées normalement dans de telles cultures, nous n'utilisons le terme plasmode, signant l'atteinte virale, que pour des cellules présentant au moins une surface égale au quart d'un champ microscopique, à un grossissement de soixante-douze fois.

Les plasmodes des cultures de cellules HeLa se différencient nettement de ceux que présentent les cultures de cellules rénales par la très grande taille qu'ils peuvent atteindre (1-2 mm de diamètre) et par leur aspect non bulleux (1<sup>er</sup> mém., pl. I, fig. 1).

Il est à noter que tous les plasmodes observés se trouvent directement en contact avec le verre et qu'il semble que ce soit une condition de leur apparition. Au centre d'une culture, les plasmodes n'apparaissent qu'au fond de trous. On les trouve le plus abondamment à quelques rangs cellulaires de la zone de prolifération sur le verre.

A l'état frais, le cytoplasme d'un plasmode est mal délimité, flou, extrêmement translucide et souvent piqueté de petits points réfringents.

Les noyaux, dont le nombre peut atteindre 200, selon l'âge du plasmode, sont tantôt concentrés en amas compact au centre, tantôt régulièrement alignés selon leur grand axe à la périphérie de la cellule, ou présentent simultanément ces deux dispositions (1<sup>er</sup> mém., pl. I, fig. 2).

Régulièrement ovales, les noyaux sont très translucides, mais ils ressortent cependant nettement du fond cytoplasmique, cerclés qu'ils sont par une ligne fortement réfringente. Ils contiennent au plus un à deux nucléoles visibles sans coloration.

Lors de leur évolution, on peut voir apparaître des fentes dans le cytoplasme ; celui-ci se décolle partiellement du verre et s'enroule comme une feuille de papier à cigarette ; cependant les

noyaux sont toujours nettement visibles, sous forme de petits grains très réfringents.

Le diagnostic différentiel entre ces cellules et les cellules géantes communément rencontrées dans les cultures de cellules HeLa de type normal est difficile à faire lorsque la cellule plasmodiale est de taille inférieure au 1/6 d'un champ microscopique au grossissement de soixante-douze fois. Néanmoins, on peut distinguer une cellule géante commune d'une cellule plasmodiale en se basant sur l'aspect plus mat et moins translucide du cytoplasme de la cellule géante commune et sur le petit nombre de noyaux, dépassant rarement une dizaine. Ces noyaux sont plus gros (souvent géants), plus ronds et plus mats que ceux d'un plasmode et comportent en moyenne plus de deux nucléoles. En outre, on trouve presque toujours ces noyaux en amas au centre de la cellule et jamais en ligne, cas le plus commun dans les cellules plasmodiales.

Lorsqu'il est coloré à l'hémalum-éosine, le plasmode frappe par son aspect général flou, comme s'il était recouvert d'une fine couche de mucus ; cependant les colorations au mucicarmin n'ont révélé aucune substance mucoïde. Ses limites sont nettes lorsqu'il est isolé, sinon il est délimité par une couronne de cellules apparemment normales, dont cependant le cytoplasme se distingue mal par endroits de celui du plasmode. On peut voir des cellules individualisées proliférant à sa surface.

Le cytoplasme est inhomogène, et, comme celui des plasmodies présentés par les cellules rénales, concentré en une masse éosinophile aux alentours des noyaux. On peut noter de petites vacuoles optiquement vides, rassemblées autour de ceux-ci, mais elles n'atteignent jamais ni le nombre, ni surtout la taille de celles que l'on voit dans les plasmodies de cultures rénales de singe. Elles ne se colorent également ni au Soudan III, ni au mucicarmin (1<sup>er</sup> mém., pl. I, fig. 3).

Les noyaux, moins basophiles que les noyaux des cellules mononucléées, ont une forme et une dimension assez semblable : nous n'avons jamais noté de macronoyaux, mais par contre des débris granulaires qui se révèlent être nucléaires à la coloration de Feulgen (1<sup>er</sup> mém., pl. I, fig. 4).

La chromatine est en règle générale plus grossière que celle des cellules normales et certains noyaux peuvent présenter une chromatine épaissie, formant un réticulum grossier entre les mailles duquel apparaissent des masses éosinophiles amorphes. Un tel aspect peut aller jusqu'à la multivacuolisation du noyau. Nous avons également observé, aussi bien à l'état frais que coloré, des noyaux complètement entourés d'une zone optiquement vide, comme s'ils se trouvaient inclus dans une vacuole. Les

nucléoles ne diffèrent pas par leur nombre et leur taille de ceux que l'on peut voir dans les noyaux normaux.

Que ce soit à l'hémalum-éosine, à la coloration de Mann ou de Giemsa, nous n'avons observé ni inclusion nucléaire, ni inclusion cytoplasmique et nous n'avons pas noté de granulations basophiles semblables à celles contenues dans les cellules rénales infectées.

Les plasmodies ne présentent aucune mitose, comme ceux des cellules rénales.

En dehors des plasmodies, les cellules de cultures infectées ne diffèrent nullement des cellules de cultures témoins.

#### LÉSIONS DES CULTURES DE CELLULES TESTICULAIRES DE SINGE.

Les fibrocytes dégèrent comme ceux des cultures rénales simiennes ou humaines, mais par contre, les plasmodies sont similaires à ceux présentés par les cultures de cellules HeLa (pl. II, fig. 6 et 7).

Nous n'avons vu dans de telles cultures que de très rares granulations basophiles cytoplasmiques semblables à celles que nous décrivons dans les cellules rénales.

#### DISCUSSION.

Les lésions des cellules épithéliales que nous avons obtenues par nos souches correspondent exactement à celles décrites par Enders et Peebles [2] sur cellules épithéliales de rein de singe, et par Rustigian, Johnston et Reinhart [8] sur cellules HeLa, et sur cellules rénales humaines et simiennes; de même les fibrocytes présentent des lésions similaires à celles observées par Rustigian et ses collaborateurs [8] et Youngner [9].

Si l'on compare l'aspect cytopathologique créé par les trois virus provoquant l'apparition de lésions plasmodiales, le virus de la rougeole, le virus des oreillons et le virus spumeux, le diagnostic différentiel peut être rapidement fait entre les lésions dues au virus rougeoleux et celles dues au groupe virus ourlien-virus spumeux.

En effet, le virus de la rougeole produit une redistribution de la chromatine des noyaux des cellules géantes multivacuolées; la chromatine, en position marginale, forme un anneau dense, coloré intensément par les colorants basiques, et une inclusion nucléaire, homogène, éosinophile apparaît [2].

De telles modifications nucléaires n'ont jamais été observées dans des cultures infectées par le virus des oreillons ou par le virus spumeux [3, 4, 7].

Par contre, si l'on se base sur les travaux de Henle, Deinhardt

et Girardi [3], les plasmodes créés par le virus ourlien dans des cultures de rein de singe ou de cellules HeLa sont morphologiquement indistinguables de ceux dus au virus spumeux. Seules des épreuves de séro-neutralisation peuvent établir une distinction entre ces deux virus [4]. Cependant, si l'on examine le temps de latence d'apparition des lésions, on s'aperçoit que les souches de virus ourlien de Henle produisent des plasmodes en vingt-quatre heures, alors que le temps de latence de souches entraînées de virus spumeux ([8] et nous-même) est d'au moins quatre jours, et qu'il faut compter en moyenne cinq à six jours avant d'obtenir de telles lésions. Ce temps de latence différent permettrait, semble-t-il, un diagnostic différentiel préalable, qui, cependant, doit naturellement être confirmé par séro-neutralisation.

Quant au diagnostic différentiel d'avec les cellules géantes communes, nous avons régulièrement observé dans les cellules HeLa normales, que, souvent très nombreuses durant les quatre premiers jours de culture, les cellules géantes diminuent rapidement de nombre et de taille, les jours suivants (1); or les cellules ne sont infectées au minimum que quarante-huit heures après leur mise en culture.

Comme nous disposons d'une souche mutée de cellules HeLa [6], souche type de Genève, ayant pour caractéristique intéressante pour nous, d'une part, de ne présenter quasiment pas de cellules géantes multinucléées et, d'autre part, de proliférer sur le verre sous forme, soit de cellules arrondies et nettement individualisées, soit de cellules étalées, mais formant alors un réticulum lâche et non un véritable placard épithélial, nous avons pu mettre en évidence qu'effectivement le temps de latence et d'apparition des lésions, apparition de cellules comportant plus de quatre noyaux, est de vingt-quatre à quarante-huit heures avec des souches entraînées, mais les plasmodes, tels que nous les définissons, n'apparaissent que dès le quatrième ou cinquième jour après l'infection.

Le fait que nous n'avons jamais observé de mitose dans les plasmodes nous avait induit à admettre avec les auteurs précités [2, 8] que les plasmodes sont en fait des aires syncytiales produites par l'action lytique du virus (2). Les observations effec-

(1) Ceci est en accord avec les travaux de Hsu [5] et de Moorhead et Hsu [7], qui trouvent 40 p. 100 de métaphases aberrantes ou multipolaires dans des cultures de cellules HeLa de quarante-huit heures, contre 10 p. 100 de telles anomalies dans des cultures âgées de 8 jours ou plus.

(2) Il serait en effet curieux de ne rencontrer aucune mitose dans les plasmodes de cellules HeLa, s'ils étaient créés par division multiple du noyau d'une cellule, car les cellules HeLa se divisent lentement [7] et on rencontre en moyenne une mitose par champ microscopique dans de telles cultures.



tuées sur les cellules HeLa, type de Genève, ont donné entièrement raison à cette hypothèse. Les cellules se fondent littéralement les unes dans les autres en perdant ainsi leur individualité ; l'examen des lames colorées montre, du reste, des atteintes discrètes des noyaux. Cependant nous avons maintes fois observé que des cultures de cellules HeLa presque entièrement formées de plasmodes font virer le milieu aussi rapidement que les cultures témoins, tant que les plasmodes sont encore collés au verre. Ceci nous induit à penser que les plasmodes ne correspondent pas à des aires de cellules détruites, mais que le syncytium cellulaire produit par le virus spumeux a encore un certain pouvoir métabolique.

A la suite de Rustigian et coll. [8] nous estimons que l'action primordiale du virus spumeux est son action lytique. Si la présence de multiples vacuoles ou bulles dans les plasmodes de cultures de rein de singe frappe, nous avons néanmoins été étonné de la disparition de cet aspect lors d'infection de cellules rénales humaines ou de cellules testiculaires de singe. Peut-être la qualité de provoquer la vacuolisation des aires lytiques a-t-elle été perdue durant les passages sur cellules HeLa. Nous n'avons en effet observé une légère vacuolisation de ces cellules que durant les tout premiers passages de nos souches. L'observation des cultures de cellules rénales humaines a montré que des bulles semblables peuvent être trouvées dans des cultures non infectées. Il nous semble donc que la présence de vacuoles ou de bulles n'est que secondaire à l'action virale, si elle l'est véritablement, le vieillissement des cultures entrant également en ligne de compte, puisque sur reins de singe, l'atteinte virale ne se précise au plus tôt qu'au dixième jour.

Par contre, la présence de granulations cytoplasmiques basophiles dans des cellules rénales humaines ou simiennes infectées nous semble extrêmement suspecte. De telles granulations font penser à des inclusions, tant par la diversité de leur taille, de leur éparpillement dans les cellules, que par leur morphologie et leurs caractères tinctoriaux.

Nous nous garderons bien cependant d'affirmer leur nature virale, principalement parce que nous n'avons observé ces « inclusions » que dans des cultures de cellules rénales. Et si les cultures de cellules rénales humaines non infectées ne présentaient aucune granulation semblable, n'ayant pas obtenu de cellules simiennes indemnes de virus spumeux, nous n'avons donc pas de témoins strictement semblables. D'autre part, nous avons pu constater que ces inclusions ne contiennent pas d'acide désoxyribonucléique, mais nous n'avons pas mis en évidence d'acide ribonucléique ni de corpuscules viraux.



*Remerciements* : Nous remercions ici M<sup>me</sup> Collombier, du Service des Virus, pour toute l'aide accordée lors de la coloration des cultures cellulaires.

## SUMMARY

### STUDY OF FOAMY VIRUS.

II. STUDY OF THE LESIONS OF MONKEY AND HUMAN KIDNEY CELLS, MONKEY TESTICULAR CELLS, AND CARCINOMATOUS HELA CELLS, INDUCED BY FOAMY VIRUS ISTRAINS FV I, FV II AND FV III).

The plasmods induced in tissue cultures by foamy virus are different from those produced by measles virus, but are morphologically identical with plasmods induced by mumps virus; however, the lag period for their appearance is longer. Mitosis are never found. The plasmods seem to be syncytial areas provoked by the lytic action of the virus. In monkey kidney cell cultures, many vacuoles are present; they do not exist in human kidney cultures or in simian testicular cultures. In human kidney cells, basophilic granulations are found, which suggest inclusion bodies, which do not contain desoxyribonucleic acid; however their exclusive presence in kidney cells does not allow to state their viral nature.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] BARSKI (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 512.
- [2] ENDERS (J. F.) et PEEBLES (T. C.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1954, **86**, 277.
- [3] HENLE (G.), DEINHARDT (F.) et GIRARDI (A.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1954, **87**, 386.
- [4] HENLE (G.) et DEINHARDT (F.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1955, **89**, 556.
- [5] HSU (T. C.). *Texas Rep.*, 1954, **42**, 833.
- [6] LÉPINE (P.), BONIFAS (V.) et PACCAUD (M.). (*A paraître*.)
- [7] MOORHEAD (P. S.) et HSU (T. C.). *J. Nat. Cancer Inst.*, 1956, **46**, 1047.
- [8] RUSTIGIAN (P.), JOHNSTON (P.) et REINHART (H.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1955, **88**, 8.
- [9] YOUNGNER (J. S.) [cité in RUSTIGIAN. *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1955, **88**, 8].

# LA SÉROLOGIE

## DES BACTÉRIOCINES ET SES APPLICATIONS

par Y. HAMON.

[avec la collaboration technique de M. Paul DUCREST et M<sup>me</sup> Y. PÉRON] (\*).

(Institut Pasteur, Service des Bactériophages)

### INTRODUCTION.

Dans une note précédente [1], nous avons exposé les résultats de nos études préliminaires concernant les propriétés antigéniques des bactériocines. Ces substances, qui comprennent les colicines et les pyocines, provoquent la formation d'anticorps neutralisants et précipitants lorsqu'elles sont injectées aux lapins. Dans ce mémoire, nous nous proposons de donner le détail des techniques employées et de préciser les principes qui nous ont guidé au cours de ces expériences. Nous indiquerons enfin quelques exemples concrets d'application de la méthode sérologique et nous préciserons la possibilité de son emploi pour essayer de résoudre quelques problèmes concernant l'étude des bactériocines et des souches bactériocinogènes.

### PRINCIPES ADOPTÉS POUR LA PRÉPARATION DES SÉRUMS.

Un sérum neutralisant ne vaut que si son pouvoir s'exerce sur une substance ou un agent biologique bien définis et hautement purifiés (protéides, polyosides, virus, particules diverses, etc.).

Prenons un exemple précis : un sérum antiphage doit être préparé à l'aide d'un lysat bactériophagique obtenu après deux ou trois prélèvements successifs de plages bactériophagiques isolées ; en d'autres termes, l'expérimentateur doit injecter à l'animal une préparation d'un bactériophage de « lignée pure. » Seul un sérum préparé suivant ce principe peut être utilisé efficacement et permettre ainsi de rapprocher ou de différencier le bactériophage injecté d'autres bactériophages ou particules diverses.

C'est avec un tel souci que nous avons réalisé nos essais en vue d'obtenir des sérums neutralisant les bactériocines. Rappelons que ces bactériocines sont des particules létales, de nature

(\*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 8 novembre 1956.

protéique (ou contenant une fraction protéique) et qu'elles sont élaborées par les Entérobactériacées (colicines) et les souches de *Pseudomonas pyocyanea* (pyocines).

Précisons que ces diverses souches bactériocinogènes élaborent souvent, non pas une seule bactériocine, mais un complexe de bactériocines, comme l'ont montré Gratia et Fredericq [2], puis Chabbert [3]. Dans son étude, Chabbert a analysé plusieurs préparations de colicines en recherchant les différences de sensibilité de leurs constituants à divers agents physiques et biologiques ; il a ainsi démontré l'existence de complexes comprenant 2, 3 ou même 5 colicines différentes. Il apparaît, d'après l'auteur, « que les tentatives de liaison entre les colicines et les groupes biochimiques ou sérologiques des bactéries colicinogènes ne peuvent être entreprises qu'à la suite d'une dissociation la plus serrée possible des complexes de colicines ».

Pour réaliser cette dissociation indispensable, nous nous sommes appuyé sur un certain nombre de propriétés des microbes bactériocinogènes : 1° transfert des propriétés colicinogènes (1) ; 2° induction de certaines propriétés bactériocinogènes ; 3° nous avons recherché également l'action des agents physico-chimiques et biologiques sur les préparations antibiotiques pour reconnaître si les cultures examinées élaboraient une ou plusieurs bactériocines.

1° *Transfert des propriétés colicinogènes.* — Ce phénomène, découvert par Fredericq [4], peut se définir de la manière suivante : certaines souches non colicinogènes d'Entérobactériacées cultivées en présence de souches colicinogènes d'*E. coli* (ou de *Sh. sonnei*) acquièrent la propriété héréditaire de produire la colicine spécifique de chacune de ces dernières souches.

Nous avons utilisé ici comme souche réceptrice, *E. coli* K 12 S, qui est universellement employée au laboratoire et considérée comme non colicinogène.

L'expérience montre qu'un nombre relativement faible de propriétés colicinogènes peuvent être transférées à *E. coli* K 12 S ; de ce fait, lorsque le transfert est obtenu, il existe une forte probabilité qu'il n'intéresse qu'une seule des propriétés colicinogènes des bactéries polycolicinogènes ; l'obtention d'une souche d'*E. coli* monocolicinogène conduit ultérieurement à une préparation de colicine « de lignée pure », que l'on pourra alors injecter à l'animal. Le transfert des propriétés colicinogènes permet donc d'obtenir parfois une dissociation biologique des complexes antibiotiques.

2° *Induction des propriétés bactériocinogènes.* — Jacob [5],

(1) Le transfert des propriétés pyocinogènes n'a pu être réalisé jusqu'à présent.



Jacob et coll. [6] ont montré qu'une exposition convenable aux U. V., ou le contact avec diverses substances mutagènes ou cancérogènes d'une culture bactériocinogène en phase exponentielle de croissance, provoque l'induction de la production antibiotique à l'ensemble de la population bactérienne considérée : après une phase de croissance résiduelle, les cultures inductibles se lysent et libèrent à ce moment une quantité importante de la bactériocine.

Les cultures bactériocinogènes inductibles, dans les conditions expérimentales adoptées ici, se sont montrées relativement rares ; il existe donc une forte probabilité pour qu'une culture antibiotique inductible ne libère que la bactériocine correspondant à sa propriété bactériocinogène inductible à l'exclusion des autres propriétés antibiotiques éventuelles.

Dans certains cas exceptionnels, une propriété colicinogène peut être à la fois transférable et inductible. Nous considérons alors que les préparations obtenues à la faveur de ces deux propriétés biologiques ont beaucoup de chances de ne contenir qu'un seul type de particules de colicine.

En effet, les souches antibiotiques capables de transférer deux propriétés colicinogènes se rencontrent rarement, et l'induction par les U. V. de l'une de ces propriétés transférée à *E. coli* K 12 inhibe l'élaboration de la colicine correspondant à la seconde propriété colicinogène.

3° *Action des agents physico-chimiques et biologiques sur les préparations antibiotiques.* — Cette étude a été entreprise avec les préparations antibiotiques fournies par les microbes à propriétés bactériocinogènes transférables ou inductibles (ou les deux à la fois). Mais elle s'applique particulièrement aux cultures bactériocinogènes pour lesquelles on ne peut transférer ni induire l'une de leurs propriétés antibiotiques et réaliser la dissociation désirée du complexe éventuel. La plupart de ces bactéries antibiotiques entrent dans cette catégorie. Pour reconnaître si les cultures étudiées sont mono- ou polybactériocinogènes, nous avons recherché les différences de sensibilité de quelques préparations antibiotiques à l'égard de la chaleur et de certaines protéases microbiennes suivant la méthode suggérée par Gratia et Betz-Bureau en 1946 [7].

Nous avons étudié également les qualités des différents milieux pour l'élaboration d'une des bactériocines du complexe éventuel ; nous avons donc isolé des mutants résistant aux bactériocines élaborées dans des milieux de culture de constitution très différente : a) milieu synthétique enrichi de divers acides aminés ; b) eau peptonée à 3 p. 100 (peptone Vaillant 5 B, ou peptone UCLAF) ; c) bouillon préparé par macération suivie d'une digestion pepsique. Nous avons ensuite recherché la sensibilité

éventuelle de ces mutants aux préparations antibiotiques ainsi obtenues. La sensibilité de certains mutants à une autre préparation antibiotique indique que l'antibiotique qui a sélectionné le mutant considéré, et l'antibiotique actif secondairement sur ce mutant, sont différents ; de ce fait, la souche étudiée ne peut être considérée comme monobactériocinogène.

Quelques souches, pour lesquelles nous n'avons pas obtenu la résistance croisée de leurs différents mutants au contact des quatre préparations antibiotiques précitées, ont été éliminées. Après les trois épreuves de sensibilité à la chaleur et aux protéases et l'étude des mutants résistants, nous n'avons conservé que les trois souches suivantes pour préparer des sérums : *E. coli* 3697, 4568 et 4872. Nous ne dissimulons pas combien ces différentes épreuves se sont avérées délicates et le résultat définitif d'interprétation difficile. En outre, certaines préparations antibiotiques, qui paraissent homogènes au cours de ces différents tests, nous ont donné un titre insuffisant qui ne laissait aucun espoir d'obtenir un sérum neutralisant, même après injection massive à l'animal.

#### MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

Nous nous sommes efforcé d'obtenir des préparations de bactériocines bien tolérées par l'animal, de titre élevé et ne contenant qu'une seule bactériocine.

Comme nous l'avons précédemment exposé, les souches bactériocinogènes, utilisées ici, peuvent être réparties en quatre groupes :

1° *Souches bactériocinogènes transférables et inductibles.* — a) *Sh. sonnei* souche P 9 (2). Elle produit la colicine  $S_3$  et donne, après transfert à la souche *E. coli* K 12 S, la nouvelle souche colicinogène TR 2'.

b) *E. coli* souche K 235 (2) qui donne, après transfert à *E. coli* K 12 S, la souche TR 7' ; elle produit une colicine du groupe K. Les propriétés colicinogènes respectives de TR 2' et TR 7' sont inductibles dans le milieu employé ici (voir ci-dessous la composition de notre milieu) après une exposition convenable aux U. V. (longueur d'onde principale 2537 Å).

2° *Souches bactériocinogènes transférables seulement.* — a) *E. coli* souche K 30 (2) qui, après transfert à la souche K 12 S d'*E. coli*, donne la souche colicinogène TR 1'.

b) *E. coli* souche n° 3609 appartenant au groupe sérologique 26 : B6 et au lysotype Birmingham déterminé par la méthode de Nicolle, Le Minor, Buttiaux et Ducrest [8]. Cette souche donne, après transfert à *E. coli* K 12 S, la souche TR B.

3° *Souches bactériocinogènes inductibles seulement.* — a) *E. coli* souche n° 153 appartenant au sérotype 55 B 5 et au lysotype Lomme ;

(2) Nous devons ces souches colicinogènes à l'obligeance du professeur Pierre Fredericq, que nous remercions vivement.

elle produit, après induction, une quantité considérable de colicine de nature indéterminée.

b) *Pseudomonas pyocyanea* souches C 5 et C 10. Une irradiation convenable de ces deux cultures provoque l'induction de leurs propriétés bactériocinogènes respectives avec lyse de chaque culture. Cette lyse s'accompagne d'une augmentation considérable de titre de la pyocine dans le milieu.

4° *Souches bactériocinogènes non transférables et non inductibles.* — a) *E. coli* souche n° 4872 ; sérotype 111 : B 4 et lysotype Tourcoing ; colicine indéterminée.

b) *E. coli* souche n° 4568 ; sérotype 26 : B 6 et lysotype Warwick ; colicine indéterminée.

c) *E. coli* souche n° 3697 ; sérotype 55 : B 5 et lysotype Béthune, colicine indéterminée.

Ces 10 souches élaborent leur bactériocine dans notre milieu, constitué principalement ou exclusivement d'une solution à 3 p. 100 de peptone tryptique (peptone Vaillant 5 B). Ce milieu qui contient une forte proportion de petites molécules (acides aminés, dipeptides), n'est pas choquant pour l'animal.

Les souches bactériocinogènes des groupes 1 et 3 sont inductibles dans ce milieu. Cependant, l'addition d'un volume de bouillon à 9 volumes d'eau peptonée Vaillant nous a paru favoriser l'élaboration des bactériocines sans nuire à la santé des animaux et nous avons généralement adopté cette solution. Après élaboration de leurs antibiotiques respectifs, les cultures sont stérilisées par le chloroforme suivant la technique préconisée par Fredericq pour les entérobactériophages [9]. Les bactéries résistant à l'action lytique du chloroforme sont éliminées par centrifugation à 6 000 tours/minute pendant cinq minutes. Toutes les préparations antibiotiques sont alors stockées à + 4° C pendant toute la durée de l'expérimentation.

Des lapins jeunes (2 kg), de races variées, reçoivent trois injections intrapéritonéales par semaine d'une dilution à 1/6 dans l'eau physiologique de ces différentes préparations (2 lapins pour chaque bactériocine).

Le volume de chaque injection est de 60 cm<sup>3</sup>, ce qui correspond à 10 cm<sup>3</sup> de préparation non diluée (cependant, au début de ce travail, nous injections 100 cm<sup>3</sup> d'une dilution au 1/10 de la préparation antibiotique ; ultérieurement, nous avons constaté qu'une dilution au 1/6 était parfaitement tolérée).

Après trois semaines de ce traitement, soit neuf injections, les lapins sont saignés à blanc par une canule introduite dans l'artère carotide. Remarquons que nos animaux supportent parfaitement le nombre élevé et le volume important des injections. Ce rythme inhabituel d'injections nous a été imposé par le faible pouvoir antigénique des bactériocines (voir la Discussion).

La technique de la neutralisation proprement dite est la suivante : La préparation de bactériocine étudiée est amenée à la dilution critique, c'est-à-dire à la plus forte dilution qui donne une inhibition confluyente sur plaque de géloseensemencée avec une quantité standard de bactéries sensibles (*E. coli* souche K 12 ou B suivant le cas).

La préparation antibiotique ainsi diluée et le sérum homologue sont alors mélangés en tubes à hémolyse dans les proportions énumérées dans le tableau I.

TABLEAU I.

	Tubes N°					
	1	2	3	4	5	6
Bactériocine à la dilution critique			0,9cm <sup>3</sup>			
Sérum homologue dilution du sérum	$\frac{1}{1}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{0,1\text{cm}^3}{20}$	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	eau
dilution finale du sérum	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{1000}$	Témoin sans sérum

Les tubes sont placés pendant vingt-quatre heures à 37° C ; on dépose ensuite une goutte de chaque tube sur une plaque de géloseensemencée avec les bactéries sensibles dans les conditions standard.

Lorsqu'il se produit une neutralisation totale, on ne remarque aucune inhibition de la culture par la bactériocine ; une neutralisation partielle se traduit par une inhibition incomplète de la culture par rapport à la goutte du témoin sans sérum.

Les titres de nos différents sérums figurent dans le tableau II.

L'examen du tableau II montre que les bactériocines se comportent comme des substances antigéniques. Le titre limite des sérums neutralisants atteint généralement la dilution de 1/200. Certaines colicines, qui possèdent cependant un titre convenable (colicines TR B et 4872), fournissent des sérums de pouvoir neutralisant très faible.

Dans le tableau III sont consignés les résultats de la sérologie croisée des diverses colicines étudiées avec les différents sérums neutralisants employés à la concentration de 1/10. Certains sérums paraissent très spécifiques de la colicine qui a servi à leur préparation (sérums neutralisant les colicines d'*E. coli* souches TR 1', TR B, 4872, 4568, TR 7' et 3697). Au contraire, la spécificité des sérums préparés avec la colicine d'*E. coli* TR 2' est moins stricte, tandis que le sérum préparé avec l'antibiotique d'*E. coli* n° 153 neutralise 5 des 8 colicines examinées. Dans ce dernier cas, on observe toutefois un taux de neutralisation plus faible pour les colicines hétérologues que pour la colicine n° 153.

Ces résultats partiels paraissent indiquer que les sérums neutralisant et précipitant les colicines sont spécifiques ; ils donnent très probablement des réactions hétérologues avec des colicines plus ou moins apparentées à celle qui a servi à leur préparation.

TABLEAU II.

Cultures bactériocinogènes	Milieu employé	Titre de la bactériocine	Dilutions des différents sérums					Sérum lapin neuf
			1/10	1/100	1/200	1/500	1/1000	
Ec TR2 <sup>+</sup> (1) Ec TR2 <sup>+</sup> (2)	(EPV9+B1)/10	IP 10 <sup>-3</sup>	NT NT	NT NT	NT NP	NP O	O O	O O
Ec TR7 <sup>+</sup> (1) Ec TR7 <sup>+</sup> (2)	(EPV9+B1)/6	IT 10 <sup>-3</sup>	NT NT	NT NT	NP NP	NP? NP?	O O	O O
Ec TR1 <sup>+</sup> (1) Ec TR1 <sup>+</sup> (2)	(EPV9+B1)/6	IT 10 <sup>-2</sup> IT 10 <sup>-2</sup>	NT NT	NT NT	NT NP	NP? O	O O	O O
Ec TRB (1) Ec TRB (2)	(EPV9+B1)/6	IT 10 <sup>-2</sup> IT 10 <sup>-3</sup>	NP NP	O O	O O	O O	O O	O O
Ec 153 (1) Ec 153 (2)	EPV/10	IT 10 <sup>-3</sup> IT 10 <sup>-3</sup>	NT NT	NT NP	NP O	O O	O O	O O
Fs C5 (1) Fs C5 (2)	EPV 12cm3 eau 80cm3	IP 10 <sup>-2</sup> IP 10 <sup>-3</sup>	NT NT	NT NT	NP NT	O NP	O O	O O
Fs C10	(EPV9+B1)/10	IT 10 <sup>-2</sup>	NT	NT	NT	NT?	O	O
Ec 472 (1) Ec 472 (2)	(EPV9+B1)/6	IT 10 <sup>-2</sup> IT 10 <sup>-2</sup>	O NP	O O	O O	O O	O O	O O
Ec 456 <sup>+</sup> (1) Ec 456 <sup>+</sup> (2)	(EPV9+B1)/6	IT 10 <sup>-2</sup> IT 10 <sup>-2</sup>	NT	NT	NP O lapin mort			O O
Fc 3697 (1) Ec 3697 (2)	(EPV9+B1)/6	IP 10 <sup>-1</sup> IP 10 <sup>-1</sup>	NP NP	O O	O O	O O	O O	O O

Ec 153 = *E. coli* souche n° 153; Ps C5 = *Pseudomonas pyocyanea* souche C5; EPV/10 = Eau peptonée Vaillant 5B diluée au 1/10 en eau physiologique; Eau = Eau physiologique; (EPV9 + B1)/10 = Eau peptonée Vaillant 5B 9 cm<sup>3</sup> + bouillon 1 cm<sup>3</sup> + eau physiologique 90 cm<sup>3</sup>; (EPV9+B1)/6 = Eau peptonée Vaillant 5B 9 cm<sup>3</sup> + bouillon 1 cm<sup>3</sup> + eau physiologique 50 cm<sup>3</sup>; IT 10<sup>-3</sup> = inhibition totale à la dilution 10<sup>-3</sup>; IP 10<sup>-4</sup> = inhibition partielle à la dilution 10<sup>-4</sup>; NT = neutralisation totale; NP = neutralisation partielle; O = pas de neutralisation.

TABLEAU III.

[illegible]



## APPLICATIONS DE LA SÉROLOGIE DES BACTÉRIOCINES.

a) Comme la sérologie des virus et en particulier des bactériophages, la sérologie des colicines présente un intérêt certain : Cette méthode permet d'établir l'identité ou la parenté de différentes bactériocines ou, au contraire, d'exclure toute parenté (Cf. tableau II) ; de ce fait, elle devra être utilisée pour classer ces antibiotiques et compléter la classification de Fredericq [9], basée principalement sur la spécificité des mutants résistants que sélectionnent les colicines.

b) Cette méthode permettra de rechercher s'il existe une parenté entre les bactériocines et d'autres particules (bactériophages, enzymes, etc.).

Rappelons que Fredericq [9] pense que les bactériophages des groupes II et III contiennent dans leurs corpuscules un constituant identique ou apparenté respectivement à la colicine E et K. Malheureusement, cet auteur [10], ainsi que Goebel et coll. [11], ont pu démontrer que ce constituant, qui détermine la spécificité d'action de ces diverses particules, n'intervenait pas pour déterminer leur spécificité sérologique.

Nous confirmons cette opinion, car le sérum neutralisant la colicine K 235 n'a pu neutraliser le bactériophage T 6 appartenant au groupe III.

c) Il serait intéressant de déterminer par la sérologie la nature des colicines élaborées par les souches d'*E. coli* de gastro-entérite infantile appartenant à chacun des types bactériophagiques de Nicolle, Le Minor, Buttiaux et Ducrest [8].

Il est possible qu'une hétérogénéité des propriétés colicinogènes, pour les souches d'un type bactériophagique considéré, permette une subdivision de ce type et, par la même occasion, améliore la précision de la méthode de lysotypie des colibacilles de gastro-entérite infantile (colicinotypie auxiliaire).

d) Comme nous l'avons déjà signalé, le pouvoir colicinogène d'une bactérie peut être transféré à une autre bactérie. La sérologie des antibiotiques, élaborés par ces souches rendues colicinogènes, montre qu'elles élaborent la colicine spécifique de la souche originelle. Cet exemple constitue une application pratique de la méthode que nous venons de réaliser [12].

e) La recherche de la neutralisation de certaines préparations de bactériocines nous a permis de reconnaître l'existence éventuelle des complexes antibiotiques ou, au contraire, de pouvoir considérer certaines souches comme élaborant une seule bactériocine. Ainsi, les souches *E. coli* K 30 et *E. coli* n° 153 nous sont apparues comme monocolicinogènes, tandis que la souche P 9 de *Sh. sonnei* nous a paru bicolicinogène.

f) Une des applications pratiques immédiates de la neutralisation des bactériocines, c'est la recherche de la lysogénéité des souches bactériocinogènes.

Généralement, cette recherche s'avère délicate pour les souches élaborant une quantité importante d'antibiotique ; ce dernier tue les bactéries sensibles et empêche ainsi la formation éventuelle de plages. Ce qui complique singulièrement cette recherche, c'est que les souches sensibles à la plupart des bactériophages de *E. coli* (souches B, K 12, C, *Sh. paradysenteriae* Y 6 R) ou des plages de *Ps. pyocyanca* (souches P 10, C 15, etc.) sont aussi sensibles respectivement à la plupart des colicines et des pyocines. Jusqu'à présent, on avait recours à l'action d'agents physiques (chaleur) ou biologiques (protéases diverses) pour inactiver les antibiotiques afin de révéler la lysogénéité de ces souches.

La sérologie, méthode simple et spécifique, met dorénavant entre les mains de l'expérimentateur un nouveau moyen d'exploration. Nous avons pu confirmer ainsi par ces différentes méthodes (action de la chaleur, des protéases, neutralisation par les sérums), la haute fréquence de la lysogénéité parmi les souches de colibacilles de gastro-entérites infantiles et parmi les souches de bacilles pyocyaniques, qui ont été trouvées lysogènes pour la plupart (Conge [13], Warner [14]).

#### DISCUSSION.

a) Nous avons préparé un certain nombre d'antisérums neutralisants spécifiques de quelques colicines ; ces sérums présentent le maximum de garantie de pureté lorsque les souches bactériocinogènes sont transférables ou inductibles (ou les deux à la fois).

En ce qui concerne la majorité des souches qui possèdent des propriétés antibiotiques non transférables et non inductibles, il faut reconnaître que la préparation de sérums de « lignée pure » est délicate. Sauf dans les cas les plus favorables, le problème de la préparation de ces sérums ne pourra être résolu que par une purification et une concentration préalables, par voie physico-chimique, de ces protéines lésales (précipitation par les sels neutres ou les solvants organiques dans des conditions variées des bactériocines obtenues en milieu synthétique, suivie d'un fractionnement électrophorétique, par exemple).

b) Malgré les essais infructueux de Gratia [15] et de FredERICQ [16], l'obtention des anticorps neutralisant et précipitant les bactériocines démontre que ces protéines antibiotiques n'échappent pas à la règle selon laquelle toutes les protéines sont antigéniques. Ces protéines présentent-elles un pouvoir antigénique élevé ? Si l'on admet qu'une colicine fixée sur une bactérie ne

peut tuer une deuxième bactérie, le nombre de particules antibiotiques dans une préparation donnant une inhibition totale à la dilution  $10^{-2}$  ou  $10^{-3}$  doit être respectivement de l'ordre de  $10^9$  et  $10^{10}$  particules par centimètre cube. Le titre d'un lysat de bactériophage atteint habituellement le même ordre de grandeur, et il suffit en général d'une seule injection correspondant à  $10\text{ cm}^3$  de préparation initiale dans le péritoine d'un lapin pour obtenir un sérum neutralisant jusqu'à  $1/2\ 000$  ou  $1/5\ 000$ . Au contraire, nos préparations de bactériocines dont nous effectuons neuf injections identiques donnent, dans la majorité des cas, un titre limite de pouvoir neutralisant égal à  $1/200$ .

Nous pouvons constater, d'autre part, que certaines bactériocines comme celles d'*E. coli* n<sup>os</sup> 4872 et 3609, malgré un titre élevé, ont un pouvoir antigénique encore plus faible (neutralisation partielle au  $1/10$  seulement). Des faits analogues se produisent, d'ailleurs, parmi les bactériophages : le sérum obtenu avec le bactériophage T 1, par exemple, malgré un titre élevé, atteint difficilement un pouvoir neutralisant supérieur au  $1/100$ .

Il faut donc reconnaître que les propriétés antigéniques des bactériocines, dans les conditions expérimentales adoptées ici, sont généralement assez peu marquées ; parfois même elles sont très faibles (3).

Cette constatation fait penser que seules une purification et une concentration physico-chimiques préalables permettront d'étendre à un plus grand nombre de souches l'étude de la sérologie des bactériocines.

#### RÉSUMÉ.

Nous avons cherché à préparer quelques sérums neutralisant les bactériocines. Ces antibiotiques, les colicines et les pyocines, sont élaborés respectivement par de nombreuses souches d'Entérobactériacées et de *Pseudomonas pyocyanea* à l'état de complexes de plusieurs antibiotiques.

Un sérum neutralisant ne valant que lorsque son activité s'exerce sur une seule substance ou un seul agent biologique

(3) A titre de curiosité, nous avons recherché si d'autres antibiotiques d'usage courant possédaient des propriétés antigéniques. La pénicilline, employée sous sa forme retard d'extencilline-bipénicilline, la néomycine et le sulfate de framycétine (soframycine), injectés à fortes doses dans le péritoine des lapins, n'ont pas provoqué l'apparition d'anticorps neutralisants.

A notre connaissance, les bactériocines constituent la seule catégorie d'antibiotiques douée de propriétés antigéniques. Nous remercions les Sociétés S. P. E. C. I. A., Diamant et Roussel, qui nous ont aimablement approvisionné en pénicilline, néomycine et framycétine.

purifié, nous nous sommes efforcé de dissocier ces complexes antibiotiques pour obtenir des sérums de « lignée pure », c'est-à-dire, préparés par injection d'un seul type de particules de bactériocines. Dans ce dessein, nous nous sommes appuyé sur certaines propriétés biologiques des microbes bactériocinogènes : a) transfert des propriétés bactériocinogènes à *E. coli* K12S considéré comme non colicinogène ; b) induction des propriétés bactériocinogènes par les U.V.

Pour les souches dont les propriétés antibiotiques ne sont ni transférables ni inductibles, nous avons cherché à reconnaître la présence de complexes antibiotiques par l'étude du comportement de ces préparations à l'égard de la chaleur, de certaines protéases microbiennes, et également par l'examen de certains mutants résistant à ces bactériocines.

Seules, les préparations antibiotiques qui nous ont paru homogènes au cours de ces épreuves ont été considérées comme monobactériocinogènes et employées pour la préparation des sérums.

A la faveur de ces différentes épreuves, nous avons pu ainsi obtenir des préparations de bactériocines non toxiques pour l'animal (eau peptonée tryptique), de titre élevé et ne contenant très probablement qu'un seul type de particules.

Des lapins jeunes, de races variées, ont reçu trois injections intrapéritonéales par semaine d'une dilution au 1/6 (ou au 1/10) de 10 cm<sup>3</sup> de ces différentes préparations antibiotiques.

Trois semaines après, les lapins qui avaient reçu neuf injections ont fourni des sérums dont le titre limite du pouvoir neutralisant atteignait généralement 1/200. Cependant deux colicines, de titre élevé (*E. coli* n<sup>os</sup> 3609 et 4872), ont fourni des sérums neutralisant seulement au 1/10 l'antigène correspondant.

Les bactériocines n'échappent donc pas à la règle selon laquelle toutes les protéines sont antigéniques. Cependant, si l'on compare leur pouvoir antigénique à celui de préparations bactériophagiques de même titre, il faut admettre que les bactériocines se comportent comme des « antigènes faibles ».

L'emploi des méthodes sérologiques dans l'étude des bactériocines revêt une importance certaine (identification et classification de ces agents, reconnaissance et dissociation des complexes antibiotiques, étude de la lysogénéité des cultures bactériocinogènes et recherches diverses).

## SUMMARY

### THE SEROLOGY OF BACTERIOCINS AND ITS APPLICATIONS.

The authors have been able to obtain preparations of bacteriocins which are not toxic for the animal, possess a high titre and very probably contain a single type of particles.

Young rabbits receive three intraperitoneal injections a week of a dilution at 1/6 (or 1/10) of 10 cm<sup>3</sup> of these different bacteriocin preparations. Three weeks later, after nine injections, their sera possess a neutralizing titre of 1/200. However, two high titre colicins (*E. coli* n° 3609 and 4872) gave sera neutralizing the homologous antigen only at 1/10.

Like any protein, bacteriocins are antigenic. However, their antigenicity is lower than that of bacteriophagic preparations of the same titre; bacteriocins must then be considered as « weak antigens ».

Serological methods are very important for the study of bacteriocins, their identification and typing, the demonstration and dissociation of antibacterial complexes, the study of lysogenicity of bacteriocinogenic cultures, and different other researches.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] HAMON (Y.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 1240.
- [2] GRATIA (A.) et FREDERICQ (P.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1947, **29**, 354.
- [3] CHABBERT (Y.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **79**, 51.
- [4] FREDERICQ (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **48**, 399.
- [5] JACOB (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **86**, 149.
- [6] JACOB (F.), SIMINOVITCH et E. WOLLMAN. *C. R. Acad. Sci.*, 1951, **233**, 1500.
- [7] GRATIA (A.) et BETZ-BAREAU. *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 1248.
- [8] NICOLLE (P.), LE MINOR (L.), BUTTIAUX (R.) et DUCREST (P.). *Bull. Acad. nat. Méd.*, 1952, **136**, 480.
- [9] FREDERICQ (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **144**, 295.
- [10] FREDERICQ (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 294.
- [11] GOEBEL (W. F.), BARRY (G. T.), JESAITIS (M. A.) et MILLER (E. M.). *Nature*, 1955, **176**, 700.
- [12] HAMON (Y.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 2064.
- [13] CONGE (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1948, **75**, 368.
- [14] WARNER (P. T.). *Brit. J. exp. Path.*, 1950, **31**, 112 et 242.
- [15] GRATIA (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 1925, **93**, 1040.
- [16] FREDERICQ (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 1624.



# CONTRIBUTION A L'ÉPIDÉMIOLOGIE DE *SH. SONNEI*

## II. — LYSOTYPIE

par Syzmona SZTURM-RUBINSTEN (\*).

(C. N. R. S. et Institut Pasteur, Service du D<sup>r</sup> DUMAS)

Le bactériophage a d'abord été décrit par Twort [1], en 1915, comme substance dissolvante, puis a reçu deux ans plus tard de d'Hérelle [2] le nom de bactériophage, qu'il a gardé. Il a été l'objet de nombreuses études ; certaines d'entre elles nous intéressent plus particulièrement. Burnet et McKie [3] signalent le rapport entre l'antigène thermostable des *Shigella* et leur sensibilité aux phages, en insistant sur l'activité de ces derniers vis-à-vis des formes R. Denys [4], en 1932, s'intéresse aux relations entre formes S et R et sensibilité à la lyse transmissible. Dunlop [5] confirme ces travaux. Zambruno [6] étudie l'action lytique de différents bactériophages sur 16 souches dysentériques. Thomen et Frobisher [7] adaptent des phages qui leur servent à différencier les dysentériques entre eux. Miller et Goebel [8] étudient les rapports entre les phases I et II de *Sh. sonnei* et leur sensibilité à une série de phages. Craigie et Brandon [9], en 1936, et Craigie et Yen [10], en 1937, établissent une méthode de détermination des types bactériophagiques dans une espèce bactérienne.

S'inspirant de la méthode de Craigie et Yen, Hammarström [11, 12], en 1947 et 1949, utilise 11 phages isolés par lui pour la lysotypie de 1834 souches « R » de *Shigella sonnei*, isolées en Suède de 1943 à 1947. Il les divise en 68 types ou sous-types. Selon lui, les souches d'un même type bactériophagique appartiennent en général au même type biochimique. Toutefois, certains types bactériophagiques se présentent quelquefois sous la forme de plusieurs types biochimiques.

Les types bactériophagiques 3 et 5 sont ceux qu'il a rencontrés le plus fréquemment : ils étaient responsables de la moitié des infections. Ensuite viennent, par ordre de fréquence décroissante,

(\*) Manuscrit reçu le 30 octobre 1956.

les types 7, 8, 12, 26, 53 et 19. Souvent le même lysotype était à l'origine de tous les cas observés au cours d'une même épidémie ; mais parfois, à côté du lysotype dominant, d'autres coexistaient.

Il attire l'attention sur une certaine instabilité du type bactériophagique *in vitro* et *in vivo*.

Plusieurs auteurs ont, depuis, utilisé les phages de Hammarström pour classer les souches de *Shigella sonnei*. Raska et Malisova [13], en 1950, s'en sont servis pour étudier 168 souches isolées en Tchécoslovaquie : 30 p. 100 étaient du type 3.

Cooper et Mayr-Harting [14], en 1951, à Bristol (Angleterre), ont, avec les mêmes phages, déterminé la lysotypie de 50 souches isolées dans cette région. Elles appartenaient à 7 types phagiques. Au cours d'une épidémie, toutes les souches appartenaient au type 81, pendant une autre, toutes étaient du type 3. Les cinq autres types ont été identifiés dans des cas isolés. Les types 81 et 82 (Coleman et Powell) n'ont pas été isolés en Suède. Les auteurs se demandent si ces nouveaux types sporadiques sont des nouveaux types indépendants ou d'anciens types modifiés.

Ludford [15], en 1953, a éprouvé 244 souches isolées en Australie. La plupart provenaient d'un camp d'émigrés. Le type bactériophagique prédominant, 19, n'a jamais été trouvé auparavant dans d'autres états d'Australie. L'auteur pense qu'il a dû être importé par les émigrés d'Europe. Il conclut que la lysotypie de *Shigella sonnei* a une valeur considérable quand il y a une corrélation avec d'autres preuves épidémiologiques.

Tee [16], en 1954, utilise 10 phages, isolés par lui-même, pour déterminer le type de 829 souches de *Shigella sonnei*. Les souches furent isolées au cours de trois années dans 11 régions d'Angleterre. Il a pu déterminer le type de toutes ces souches. Il obtint 20 types phagiques ; 74 p. 100 des souches appartenaient au même type. Tee conteste la valeur pratique du procédé pour l'épidémiologiste pour trois raisons : la plupart des souches sont du même type phagique ; il est donc impossible d'identifier les différentes sources d'infection. L'instabilité des souches *in vitro* suggère qu'elles sont très probablement instables *in vivo*. D'autre part, le rôle éventuel des porteurs chroniques de *Sh. sonnei*, comme source d'infection, n'a pas été démontré.

#### LYSOTYPIC.

Le terme lysotypie a été introduit par P. Nicolle et ses collaborateurs [17] : c'est la caractérisation des types au moyen des bactériophages.

Nous avons, en 1955, fait la lysotypie de 82 souches de *Shigella sonnei*, isolées en France, et 52 isolées en France d'Outre-Mer.

*Technique.* — Bien que les variations de technique puissent entraîner certaines divergences dans les résultats, nous avons dû apporter quelques modifications aux méthodes de Hammarström, notamment pour la préparation du milieu de culture.

*Le milieu pour la lysotypie.* — Tenant compte des indications de Hammarström [12] et de Nicolle et Jude [18] sur l'importance de la peptone qui entre dans la composition du milieu, nous avons fait des essais avec la peptone Chapoteaut et Vaillant (5 B).

C'est cette dernière qui a donné les meilleurs résultats dans une série d'essais. La culture était plus abondante, la lecture s'effectuait plus facilement. Nous avons donc préparé la gélose selon la formule proposée par Nicolle et collaborateurs.

Macération de viande .....	500
Eau du robinet .....	500
Gélose japonaise .....	15 g
Peptone [Vaillant (5 B)] .....	20 g
NaCl .....	5 g
pH .....	7,2

*Les phages.* — Le Dr Hammarström a eu l'amabilité de nous envoyer les 12 phages qui lui ont servi pour typer les souches de *Shigella sonnei* isolées en Suède. Cinquante-sept souches qui correspondaient aux types phagiques déterminés y ont été jointes. Nous avons reproduit les phages sur les souches correspondantes et les avons titrés sur notre gélose pour déterminer nos dilutions critiques.

Reproduction du phage : deux bouillons sont ensemencés le matin avec 1 goutte de culture jeune de la souche avec laquelle le phage est reproduit. On ajoute aussitôt, à un tube, 1 goutte du filtrat du phage ; l'autre sert de témoin. Les deux tubes sont mis à l'étuve à 37°. On observe les cultures. Le bouillon additionné du phage se trouble avant le tube témoin. Ensuite le tube témoin devient de plus en plus trouble, tandis que le bouillon additionné du phage s'éclaircit complètement (entre quatre à cinq heures après l'ensemencement). C'est à ce moment que le bouillon est filtré.

Notre dilution critique est la plus grande dilution donnant encore une lyse confluyente, dans une culture sur gélose, de la souche sur laquelle le phage a été reproduit.

Le tableau I expose les dilutions de filtrats dont nous nous sommes servie.

Pour ajuster nos dilutions-tests nous avons procédé de la façon suivante : tout d'abord le titrage se faisait avec les dilutions de l'ordre de 1/10, 1/100, 1/1 000, etc. Ce titrage nous permettait de choisir deux dilutions limites entre lesquelles se trouvait celle qui répondait à nos exigences.

TABLEAU I.

Phage	Dilution critique	Phage	Dilution critique
I	1 : 4000	VII	1 : 7000
II	1 : 150	VIII	1 : 400
III	1 : 500	IX	1 : 300
IV	1 : 8000	X	1 : 60
V	1 : 30	XI	1 : 400
VI	1 : 300	XII	1 : 400

Par exemple :

1/10  
lyse confluyente  
+++

1/100  
lyse confluyente  
+++

1/1 000  
lyse semi-confluyente  
++

c'est entre 1/100 et 1/1 000 qu'il faut chercher notre dilution critique. Le titrage suivant s'effectuait avec les dilutions serrées de double en double 1/100, 1/200, 1/400, etc. Nous avons commencé par typer les souches-tests de Hammarström cultivées sur notre gélose avec nos dilutions de phages. Les résultats correspondaient à peu près à ceux donnés par cet auteur. Cependant, nous avons dû, en apportant de légères modifications aux données de Hammarström [42], faire un nouveau tableau, que nous utilisons pour classer nos souches en types phagiques.

Toutes les cultures éprouvées se trouvent en phase II, selon la recommandation de Hammarström. Cette forme de *Shigella sonnei* est, en effet, la plus stable ; elle est aussi la plus sensible. Le contrôle s'effectue systématiquement par l'observation de la morphologie des colonies, l'agglutination par un sérum spécifique et la recherche de la sensibilité au phage XII, qui est actif vis-à-vis de toutes les souches de *Shigella sonnei* en phase II.

TABLEAU II.

Souches	P		H		A		G		E		S		Lysotype
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	
Duf.	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	2
Soug.	++	+++	+++	qq. plages	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	8
Valence	-	+++	-	-	+++	-	-	-	-	+++	+++	++	66

II gouttes de culture en bouillon de dix-huit heures sont étalées le matin, avec une pipette Pasteur coudée, sur une plaque de gélose préalablement séchée vingt-quatre heures à 37°. Les gouttes des filtrats sont réparties aussitôt après avec des pipettes Pasteur rééfilées. Après les avoir laissé sécher sur la table du laboratoire, on retourne les boîtes et on les met à l'étuve à 37°. La recherche des résultats s'effectue cinq à six heures plus tard à l'aide d'un appareil pour lecture de microfilms ( $D \times 10$ ). Les boîtes restent ensuite jusqu'au lendemain sur la table du labo-

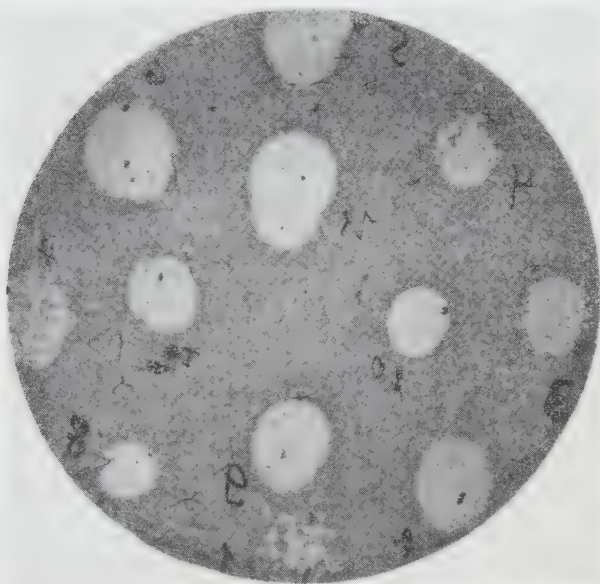


FIG. 1. — Lysotype 2.

ratoire : c'est à ce moment que se fait la deuxième lecture. En général, les deux résultats se confirment réciproquement.

Naturellement, les résultats varient d'un phage à l'autre et d'une souche à l'autre. Nous avons considéré qu'il y a lyse confluyente quand l'espace où la goutte du filtrat a été déposée est vierge. Nous le notons par trois croix (+++). A l'opposé, si le phage est sans action, nous mettons le signe négatif (—). La lyse semi-confluyente est marquée par deux croix. Quelques phages isolés sont considérés par nous comme dépourvus d'action (tableau II et fig. 1).



## RÉSULTATS.

En France, 69 de nos souches ont pu être classées suivant le schéma de Hammarström. Les 13 autres souches se répartissent en 7 lysotypes nouveaux : Pian., Del., Dog., Man., Gil., Sail. et Rob. Parmi ces dernières souches, quatre ont été isolées en 1949-1950 ; il est possible qu'elles aient subi une mutation au cours de leur conservation et qu'elles n'aient pu, pour cette raison, être classées de façon satisfaisante. Le type Pian. a été trouvé cinq fois, d'abord en 1953 à Villeneuve-sur-Lot, ensuite trois fois en 1954 et une fois en 1955 à Paris. Les types Dog., Del. et Sail. sont représentés chacun par deux souches ou une seule isolées en 1954 ou 1955.

Nous avons trouvé quatre types biochimiques en France ; les types *a*, *b*, *c* et *d*. Nous avons rassemblé tous les types bactériophagiques qui correspondent au même type biochimique (voir tableau III).

TABLEAU III.

Type biochimique	Nombre de Souches	Type bactériophagique	Nombre des types bacteriophagiques
a	14	66, 2, 17, 65, 49, 50, Guil.	7
b	1	68	1
d	55	8, 14a, 38, 22, Pian., 49, 43, 33, 3a, 12a, 50a, 17a, 66a, Del., Rb., Man., Sail., Dog.,	18
c	12	8, 14a, 49, Pian., 2a, Del.	6

Les types bactériophagiques sont rangés par ordre de fréquence décroissante.

Aux 14 souches du type biochimique *a*, correspondent 7 lysotypes, dont les plus fréquents sont 66, 2 et 17. Les 55 souches du type *d* sont réparties en 18 lysotypes, par ordre de fréquence décroissante 8, 14 a, 38, 22, Pian...

Les 12 souches du type *c* appartiennent aux 6 types phagiques : 8, 14 a, 49, Pian., 2a, Del.

Le type *b* est rencontré une fois, il est du type bactériophagique 68 qui n'a été trouvé que cette seule fois.

Les tableaux IV, V et VI indiquent la répartition des types biochimiques et les types bactériophagiques qui leur correspondent.

Le type *d* est de beaucoup le plus fréquent : 55, soit 67,00 p. 100 du total des souches appartiennent à ce type. Presque la moitié de ces souches est du type bactériophagique 8 : 23 souches, c'est-à-dire 41,81 p. 100. Viennent ensuite, par ordre de fréquence décroissante, les types 14 a, 38, 22, Pian., 49, etc.

Le type *a* : 14 souches sur 82 sont du type biochimique *a*

(17,07 p. 100). Ici le lysotype le plus fréquent est le 66, ensuite ce sont les types 2 et 17.

Le type c : sur 12 souches, 3 sont du type 8, ensuite, par ordre de fréquence décroissante, on trouve le 14 a, Pian., 49, comme pour le type d.

Le type 8 est de beaucoup le plus fréquent : 33 p. 100 des souches isolées à Paris, 31, 25 p. 100 des souches étudiées lui appartiennent, et ceci en dehors de toute épidémie, puisque,

TABEAU IV.

Type biochimique a 17,07 % des souches		La fréquence des types phagiques qui lui correspondent							
Année	Nombre des souches								
1948	1	2(1)							
1949	2	56(1)		65(1)					
1950	4	2(1)		17(1)		49(1)		66(1)	
1951	1	56(1)							
1952	0								
1953	1	2(1)							
1954	4	5(3)		17(1)					
1955	1	50(1)							
Total	14	56(5)	2(3)	17(2)	65(1)	49(1)	66(1)	50(1)	
Pourcentage		35,70	21,45	14,30	7,15	7,15	7,15	7,15	
Type biochimique b 1 souche : 1,25 %		Type phagique correspondant							
Année	Nombre de souche								
1954	1	68							

Le chiffre entre parenthèses indique la quantité des souches du même type phagique.

à l'exception de quatre contaminations familiales, nos cultures proviennent de cas sporadiques. Le même lysotype se retrouve à Nantes, au lac de Grandieu, à Bordeaux, à Caen.

Toutes ces souches seraient du même type biochimique, xylose, rhamnose positif en vingt-quatre heures, si leur délai d'acidification du maltose était identique. Les types 66 et 14 viennent en second dans l'ordre de fréquence (7,50 p. 100). Le type 66 a également été signalé en Angleterre par Mayr-Harting [49], mais deux souches sur trois avaient été isolées de sujets venant de France. Le type 3, fréquent en Suède, Angleterre, Tchéco-

TABLEAU V.

La fréquence des types phagiques qui lui correspondent

Type biochimique d 57,00 % des souches	Année	Nombre de Souches										
1949	5	3(1)	14a(3)									Del.
1950	11	8(4)	14a(1)	33(1)	43(1)						50a(1)	17a(1)
1951	7	8(4)		22(1)	43(1)	33(1)					13a(1)	nb. d'ag.
1952	4	9(2)			43(2)							
1953	6	8(2)	38(1)	P. an. (1)		3a(1)					30a(1)	
1954	14	3(6)	38(2)	(2)	P. an. (1)	33(1)	3a(1)					Sail.
1955	3	3(5)			P. an. (1)							
Total	25	3(23)	14a(4)	33(4)	22(3)	43(3)	43(1)	17a(1)	17a(1)	17a(1)	17a(1)	4 non classées
Pourcentage		41,21	7,30	7,30	5,45	2,45	3,23	3,23	1,40	1,40	1,31	1,31

TABLEAU VI.

Type biochimique c 14,50 % des souches	Année	Nombre de Souches	Types phagiques correspondant									
1943-1951	0											
1952	1	3(1)										
1953	1										2a(1)	
1954	3	8(2)	14a(2)	P. an. (2)	43(1)						Del(1)	
1955	2		14a(1)			49(1)						
Total	12	8(3)	14a(3)	P. an. (2)	43(2)	2a(1)	Del(1)					
Pourcentage		25	25	13,36	13,36	3,33	3,33					

## LÉGENDE DU TABLEAU V

Le chiffre entre parenthèses indique la quantité des souches du même type phagique.

## LÉGENDE DU TABLEAU VI

Le chiffre entre parenthèses indique la quantité des souches du même type phagique.

slovaquie, est représenté par une seule de nos souches. Elle a été isolée dans le Pas-de-Calais.

Dans les contaminations familiales observées, on a identifié dans 3 cas le même lysotype chez les différents malades. Dans le quatrième cas, 2 souches, isolées en même temps de frères jumeaux, appartenaient respectivement aux types 8 et 14. Une troisième, isolée dix jours plus tard de leur sœur, était du type 8.

En France d'Outre-Mer (voir tableaux VII et VIII), 46 souches ont pu être classées dans le schéma de Hammarström. Six donnent des lysotypes nouveaux. Quatre souches, Madag. 12 et 49, Hanoï 8303 et 7108, ont été conservées depuis 1949 et 1950 dans notre collection. On pourrait penser à une mutation pour ces quatre souches conservées au laboratoire, mais deux autres souches Braza 50 et BD. 4268, d'isolement récent, sont aussi impossibles à classer.

*Madagascar* : Les 7 souches sont toutes du type biochimique « a » ; 5 souches sont classées dans deux lysotypes 38 et 17.

*Hanoï* : Sur 17 souches, 13 sont du type « a » ; elles se répartissent en 6 lysotypes 31, 38, 17, 49, 14, 7108. Les 3 souches du type « b » sont toutes du même lysotype 31 ; c'est le type le plus fréquent, 41,16 p. 100 des souches lui appartiennent ; nous ne l'avons pas rencontré en France.

Le lysotype Hanoï 8303 est du type biochimique « l ».

Nous avons réuni les souches isolées en Afrique noire. A Bobo-Dioulasso et Bamako, les souches du type « g » (le plus fréquent) se répartissent en 6 lysotypes : 14, 38, 33, 43, 17 et BD. 4268. Les 5 souches du type « a » appartiennent aux types bactériophagiques 14, 12, 52 et 17. Les 5 souches du type « d » sont des lysotypes 14, 38, 12 a et 49. Les 2 souches du type « l » appartiennent aux types 12 et Braza 50. La souche du type « k » est un lysotype 14. Ce qui frappe pour ces souches, c'est le fait que le type 14 est le plus fréquent (36 p. 100), on le retrouve dans tous les types biochimiques.

#### CONCLUSION. — DISCUSSION DES RÉSULTATS.

La division de *Shigella sonnei* en types biochimiques sur la base de la fermentation du rhamnose et de l'utilisation ou non du xylose (a et b, c et d) a un intérêt incontestable. La subdivision de ces types sur la base de la fermentation plus ou moins tardive du maltose semble avoir une importance moindre.

*Maltose*. Nous avons mentionné que le temps d'utilisation du maltose est instable. Certaines de nos souches l'attaquaient tardivement (six à neuf jours) dès l'isolement. Reprises six à vingt-quatre mois plus tard, elles l'acidifiaient en vingt-quatre heures à trois jours.

TABLEAU VII.

Origine	Année	Nombre de Souche	Types biochimiques	Types bactériophagiques
Madagascar	1949	7	a	38(3) 17(2) D12(2)
Hanoï	1950	13 3 1	a b L	31(4) 17(3) 38(2) 49(2) 14(1) H7108(1) 31(3) H3303(1)
Afrique occidentale et équatoriale française	1953-1954-1955	5 5 12 1 2	a d g k L	14(2) 12(1) 52(1) 17(1) 14a(2) 12a(1) 38(1) 49(1) 14(4) 38(3) 33(2) 43(1) 17(1) B.D.4268(1) 14(1) 12(1) Braz.50(1)

Le chiffre entre parenthèses indique la quantité des souches du même type phagique.

TABLEAU VIII.

Origine	Année	Nombre de Souches	Types bactériophagiques.									
Madagascar	1949	7	Types	38(3)	17(2)	D.12(2)						
			Pourcentage	42,85	28,57	28,57						
Hanoï	1950	17	Types	31(7)	17(3)	38(2)	49(2)	14(1)	H.8303(1)	H.7108(1)		
			Pourcentage	41,16	17,64	11,76	11,76	5,88	5,88	5,88		
A.O.F. et A.E.F.	1953 1954 1955	25	Types	14(9)	38(4)	12(3)	33(2)	17(2)	52(1)	49(1)	43(1)	BD468(1)
			Pourcentage	36	16	12	8	8	4	4	4	4



*Rhamnose.* Sur 132 souches, 131 acidifient le rhamnose. L'acidification tardive de ce monosaccharide caractérise nos souches de certaines régions d'Afrique. Ce caractère se retrouve de 1952 à 1955. Au cours de notre observation, ce trait est constant.

*Xylose.* Dans de très nombreux pays où *Shigella sonnei* fut fréquemment isolé, comme les pays scandinaves, l'Allemagne et à l'est de l'Europe, la plupart des souches sont xylose-négatives. En France, par contre, les souches xylose-positives sont en majorité. C'est un caractère très stable. La présence des souches xylose-positives dans une épidémie à côté des souches classiquement xylose-négatives, montre l'existence de deux sources d'infection. Ainsi, en France d'Outre-Mer, les souches xylose-positives sont isolées chez les malades européens et sont très vraisemblablement d'origine métropolitaine. Les souches indigènes se caractérisent, nous le rappelons, par la non-fermentation du xylose. En éliminant le maltose comme moyen de différenciation de *Shigella sonnei*, nous proposons de garder le rhamnose et le xylose. En effet, il nous semble que le maltose ne permet, ni du point de vue biochimique, ni du point de vue épidémiologique, de classer les souches. Aussi réunissons-nous *a* et *b* en type *a*, *c* et *d* en type *d*, *g*, *e* et *l* en type *g*. Et nous proposons le type *k* rhamnose et xylose-négatif. Les souches xylose-négatives attaquent le lactose et le saccharose, les souches xylose-positives n'acidifient pas ces disaccharides (tableau IX).

TABLEAU IX.

Type biochimique	Rhamnose	Xylose	Lactose	Saccharose
a				
a	+ 1 - 2	-	+	+
b				
c				
d	+ 1 - 2	+ 1-2	-	-
d				
g				
e				
g	+ > 2	-	+	+
l				
k	-	-	+	+

La lysotypie nous fournira une raison de plus d'adopter cette simplification due à la suppression du maltose.

Les mutants de *Shigella sonnei*, isolés expérimentalement [20] attaquant rapidement le lactose, n'acidifient pas le xylose,

L'identification biochimique n'a permis d'observer aucune différence entre les souches originales et les mutants, si ce n'est leur différence d'activité sur le lactose. Ces mutants ne se distinguent pas non plus par leurs lysotypes, ils sont du même type bactériophagique que les souches originales.

Hammarström trouve que les souches d'un même type bactériophagique appartiennent en général au même type biochimique. Toutefois, certains types bactériophagiques peuvent se présenter sous la forme de plusieurs types biochimiques. Il fait suivre de la lettre (a) le chiffre qui désigne le lysotype lorsque la souche appartient à un sous-groupe biochimique particulier.

Nous pensons que le rapport entre les types biochimiques et bactériophagiques n'est pas étroit. Cependant, il y a un pourcentage élevé de souches du même type biochimique qui correspondent à un type bactériophagique donné. Ainsi le type biochimique « d », le plus fréquent en France, appartient en majorité importante au lysotype 8 (40 p. 100). Sur le tableau de Hammarström, le type 8 est caractéristique en premier lieu des souches du type biochimique « d ».

Pour le type « c » on aperçoit le même ordre de fréquence des types bactériophagiques que pour le « d » (tableaux V et VI).

Pour le type biochimique « a », le type phagique le plus fréquent est le 66, ensuite le 2 et le 17 (tableau IV). Si les types 8, 14, 38, Pian. ne se rencontrent pas en France pour les souches du type biochimique « a », le 49, par exemple, se retrouve dans tous les types. Le 66 fut trouvé une fois pour une souche « d », le 2 a pour une souche du type « c ». En étudiant le rapport entre les types biochimiques et bactériophagiques des souches de France d'Outre-Mer, on constate que les mêmes observations s'imposent. A Hanoï, le lysotype 31 est le plus fréquent et correspond aux types a et b que nous réunissons. Mais en Afrique on rencontre les lysotypes 38, 49 et 12 dans les types biochimiques distincts a et d.

On peut conclure que les souches de *Shigella sonnei* peuvent être classées, d'une part selon leur pouvoir fermentatif du xylose et rhamnose, d'autre part selon les lysotypes. Ces dernières sont beaucoup plus nombreuses. Un lysotype donné n'est pas invariablement lié à un certain type biochimique, mais il y a toujours prédominance d'un lysotype concordant avec tel ou tel type biochimique.

L'espèce *Shigella sonnei* peut être subdivisée en de nombreux types. L'étude de la sensibilité aux 11 phages de Hammarström de 80 souches isolées en France a permis de distinguer 23 types différents. En France d'Outre-Mer, nous avons 14 types bactériophagiques pour 52 souches. Les types 31, 52 et les cinq nouveaux n'ont pas été rencontrés en France. L'intérêt épidémiologique de

la lysotypie de *Shigella sonnei* dépend de la stabilité des lysotypes, de l'uniformité des résultats obtenus pour des souches isolées d'individus différents mais contaminés à une même source. Il nous est impossible de l'apprécier puisque nos souches proviennent en général de cas sporadiques. Dans l'épidémie familiale, où deux frères jumeaux étaient infectés respectivement par les lysotypes 8 et 14, une défaillance de la méthode paraît plus vraisemblable qu'une contamination simultanée à des sources différentes; cette dernière hypothèse ne peut cependant pas être écartée.

La multiplicité des lysotypes correspond sans doute à la diversité des sources d'infection, mais il est possible aussi que surviennent *in vivo*, sous l'action des bactériophages présents dans l'intestin, des variations de la sensibilité microbienne.

#### RÉSUMÉ.

La lysotypie permet de diviser 137 souches de *Sh. sonnei* en 30 types phagiques. Bien que les souches étudiées proviennent de cas sporadiques, elle met en évidence la prédominance de certains lysotypes dans certaines régions.

#### SUMMARY

##### STUDY OF *Shigella sonnei* EPIDEMIOLOGY

#### II. — PHAGE-TYPING

Phage-typing has allowed to classify 137 strains of *Sh. sonnei* into 30 types. Although the strains studied have been isolated from sporadic cases, the method demonstrate the prevalence of certain types in certain regions.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] TWORT (F. W.). *Lancet*, 1915, **2**, 1241.
- [2] HÉRELLE (F. D'). *C. R. Acad. Sci.*, 1917, **465**, 373.
- [3] BURNET (F. M.) et MCKIE (M.). *J. Path. Bact.*, 1930, **33**, 637.
- [4] DENYS (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1932, **48**, 349.
- [5] DUNLOP (S. J. C.). *Antonie v. Leeuwenhoek*, 1943, **9**, 41.
- [6] ZAMBRUNO (D.). *Giorn. Batt. Immun.*, 1938, **21**, 515.
- [7] THOMEN (L. F.) et FROBISHER (M.). *Am. J. Hyg.*, 1945, **42**, 225.
- [8] MILLER (E.) et GOEBEL (W. F.). *J. exp. Med.*, 1949, **90**, 225.
- [9] CRAIGIE (J.) et BRANDON (K. F.). *J. Path. Bact.*, 1936, **43**, 223.
- [10] CRAIGIE (J.) et YEN (C. H.). *Trans. roy. Soc. Canada*, 1937, **5**, 49.
- [11] HAMMARSTRÖM (E.). *Lancet*, 1947, **252**, 102.

- [12] HAMMARSTRÖM (E.). *Acta med. scand.*, 1949, suppl. n° 223.
- [13] RASKA, MALISOVA (V.) et MAZACEK (M.). *Cas. Lek. Ces.*, 1950, **89**, 835.
- [14] COOPER (K. E.) et MAYR-HARTING (A.). *Brit. med. J.*, 1951, **2**, 271.
- [15] LUDFORD (C. G.). *Austral. J. exp. Biol.*, 1953, **31**, 545.
- [16] TEE (G. H.). *J. Hyg.*, 1955, **53**, 54.
- [17] NICOLLE (P.), JUDE (A.) et BUTTIAUX (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **79**, 246.
- [18] NICOLLE (P.) et JUDE (A.). *Rev. Immunol.*, 1951, **15**, 31.
- [19] MAYR-HARTING (A.). *J. gen. Microbiol.*, 1952, **7**, 382.
- [20] RUBINSTEN (S.) et THIBAUT (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **82**, 104.

# L'ASSIMILATION DE L'ANHYDRIDE CARBONIQUE PAR LES BACTÉRIES CHIMIOAUTOTROPHES

par J.-P. AUBERT, G. MILHAUD et M<sup>lle</sup> J. MILLET (\*).

(Institut Pasteur, Laboratoire des Isotopes)

Le mode d'assimilation de l'anhydride carbonique par les bactéries chimioautotrophes demeurerait jusqu'à présent inconnu. Cette question a été résolue avec *Thiobacillus denitrificans* grâce à l'emploi du  $^{14}\text{CO}_2$  et nous avons précédemment exposé nos résultats dans trois brèves communications [1, 2, 17] que ce mémoire explicite.

## I. — CONDITIONS D'ASSIMILATION DU $\text{CO}_2$ .

La souche de *Thiobacillus denitrificans* (souche « Paris ») a été isolée de la terre des jardins de l'Institut Pasteur par le professeur C. B. van Niel. Toutes les cultures ont été faites en anaérobiose à 30° dans le milieu suivant :

$\text{ClNH}_4$ .....	0,5 g
$\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ .....	0,5 g
$\text{PO}_4\text{KH}_2$ .....	2,0 g
$\text{NO}_3\text{K}$ .....	2,0 g
$\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ .....	5,0 g
$\text{CO}_3\text{Na}_2$ .....	2,5 g
$\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ .....	0,01 g
$\text{CaH}_2\text{N}$ .....	10 ml
Eau distillée .....	q. s. p. 1 000 ml

Nous avons comparé le taux d'incorporation du  $^{14}\text{CO}_2$  (radioactivité spécifique, 20 mC/mM) selon que le milieu contient ou non du thiosulfate et du nitrate. Après quarante-huit heures d'incubation dans le milieu complet, les bactéries sont centrifugées puis remises en suspension dans du milieu de culture neuf en présence de  $^{14}\text{CO}_3\text{Na}_2$ . Lorsqu'on ajoute 20  $\mu\text{C}$  de carbonate à 2 ml de milieu complet contenant 0,7 mg de bactéries, on retrouve dans les bactéries 0,78  $\mu\text{C}$  après une minute d'incubation, 2,9  $\mu\text{C}$  après cinq minutes et 13  $\mu\text{C}$  après vingt minutes. En absence de thiosulfate et de nitrate, on ne retrouve que 0,003  $\mu\text{C}$  dans chaque cas.

(\*) Manuscrit reçu le 21 novembre 1956.



## II. — IDENTIFICATION DES COMPOSÉS FORMÉS.

Dans cette étude, seuls nous intéressent les composés intermédiaires de faible poids moléculaire. Ces composés sont facilement extractibles par traitement des bactéries à l'alcool à 80 p. 100 et à 20 p. 100 bouillant pendant une minute. Les deux extraits sont réunis, concentrés, puis chromatographiés sur papier Whatman n° 4 lavé à l'acide oxalique, dans le système de solvants suivants : phénol saturé d'eau, *n* butanol-acide propionique-eau (2-1-1,4). On procède ensuite à la radioautographie.

Les méthodes d'identification des différents composés ont été exposées précédemment [3]. Après cinq minutes d'incubation, nous avons caractérisé les corps suivants :

*Composés phosphorylés* : ribulose-1-5-diphosphate, glucose-6-phosphate, fructose-6-phosphate, sédoheptulose-phosphate, sérine-phosphate ; acides 3-phosphoglycérique, phosphoénolpyruvique et phosphoglycolique.

*Acides* : citrique, malique, succinique, glycolique et lactique.

*Acides aminés* : acide aspartique, acide glutamique, sérine, thréonine, lysine, tyrosine, méthionine sulfoxide, proline, valine, leucine, isoleucine, norleucine, ainsi que l'asparagine et la glutamine.

*Dérivés nucléiques* : l'uridine-diphosphate-glucose, l'uridine-diphosphate-acétylglucosamine, ainsi que des dérivés phosphorylés formés de ribulose lié à l'uridine et de ribose lié à l'uridine, à la désoxyadénosine et à la désoxyinosine.

III. — CINÉTIQUE DE L'INCORPORATION DU CO<sub>2</sub>.

Après dix secondes d'incubation en présence de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, la radioactivité de l'extrait alcoolique est répartie dans cinq taches principales correspondant à l'acide 3-phosphoglycérique, aux hexoses-phosphates, au sédoheptulose-phosphate, au ribulose-diphosphate et à l'acide aspartique.

L'analyse cinétique permet dans des conditions définies d'établir la relation reliant dans le temps des corps d'une même famille biochimique. Si l'on trace, pour les différents intermédiaires, les courbes représentant l'incorporation relative de la radioactivité en fonction du temps, l'allure des courbes permet de définir le composé précurseur. La théorie de cette analyse a déjà été exposée [3, 4].

La figure 1 exprime les résultats de l'analyse cinétique relative à l'acide 3-phosphoglycérique, au sédoheptulose-phosphate, aux hexoses-phosphates et au ribulose-1-5-diphosphate.

Après dix secondes, l'acide 3-phosphoglycérique contient à lui

seul les  $3/4$  de la radioactivité. Pendant la première minute, ce pourcentage diminue régulièrement tandis qu'augmente celui relatif aux hexoses-phosphates et au sédoheptulose-phosphate, le pourcentage de la radioactivité du ribulose-diphosphate demeure à peu près constant. Il ressort de ces résultats que l'acide 3-phosphoglycérique est le premier intermédiaire stable de l'incorporation du  $\text{CO}_2$ . La figure 1 montre d'ailleurs que si l'on extrapolait les courbes, dans les temps les plus courts le pourcentage relatif de

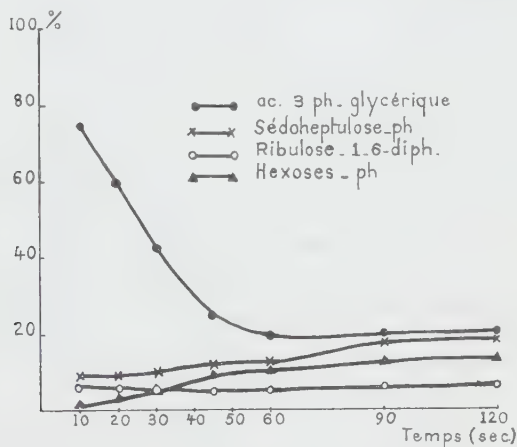


FIG. 1. — Pourcentage de la radioactivité incorporée dans différents composés par rapport à la radioactivité totale présente dans l'extrait.

la radioactivité de ce composé serait voisin de 100. Le sédoheptulose-phosphate et les hexoses-phosphates sont synthétisés ultérieurement.

#### IV. — MODE DE MARQUAGE DES PREMIERS INTERMÉDIAIRES FORMÉS.

La répartition de la radioactivité à l'intérieur de la molécule des intermédiaires formés dans les temps courts doit permettre de comprendre le mécanisme d'incorporation du  $\text{CO}_2$ . Nous avons donc déterminé la radioactivité de chacun des atomes de carbone de l'acide 3-phosphoglycérique, du fructose-6-phosphate, du sédoheptulose-phosphate et du ribulose-diphosphate, formés après dix secondes d'incubation en présence de  $^{14}\text{CO}_2$ .

Les composés sont soumis à l'action de la polidase « S » puis purifiés par chromatographie sur papier.

L'acide glycérique est dégradé selon la méthode à l'acide perio-

dique [5], le  $\text{CO}_2$  résultant est transformé en  $\text{CO}_3\text{Ba}$ , l'acide formique en formiate de baryum et la formaldéhyde en 2-4-dinitro-phénylhydrazone.

L'analyse des oses nécessite l'emploi de plusieurs méthodes. On sait que l'oxydation des phénylosazones au periodate [6] permet d'analyser, pour les sucres qui nous intéressent, les carbones 1 + 2 + 3 sous forme de phénylosazone de la mésoxaldéhyde, les carbones 4 du ribulose, 4 + 5 du fructose et 4 + 5 + 6 du sédoheptulose sous forme d'acide formique et les carbones terminaux sous forme de formaldéhyde. Nous inspirant d'un travail de Y. Khouvine et coll. [7], nous avons constaté que dans certaines conditions l'attaque directe des cétooses à l'acide periodique transforme quantitativement les carbones terminaux en formaldéhyde, le carbone 2 en  $\text{CO}_2$  et les autres en acide formique. Pratiquement, pour le fructose par exemple (qui peut servir d'entraîneur pour le ribulose et le sédoheptulose), on chauffe pendant une heure, à  $55^\circ$ , 40 mg de sucre dissous dans 5 ml d'acide periodique normal, puis on distille sous haut vide dans la soude. Le  $\text{CO}_2$  est précipité sous forme de  $\text{CO}_3\text{Ba}$ , le liquide résiduel alcalin est distillé à sec dans une solution acide de 2-4-dinitrophénylhydrazine, ce qui permet de récupérer la formaldéhyde. Puis le résidu acidifié est à nouveau distillé, le distillat est neutralisé à la baryte, on concentre puis cristallise le formiate de baryum dans un mélange éthanol-eau.

Pour le ribulose ces deux méthodes suffisent : la première donnant l'analyse des carbones 1 + 2 + 3, 4, 5, la seconde celle des carbones 1 + 5, 2, 3 + 4.

Pour le fructose, ces deux méthodes permettent d'analyser les carbones 1, 2, 3 et 6 mais donnent seulement la somme 4 + 5. La fermentation par la levure de boulangerie en anaérobiose transforme en  $\text{CO}_2$  les carbones 3 + 4, ce qui permet une analyse complète.

Pour le sédoheptulose, les deux méthodes d'oxydation donnent la valeur des carbones 1, 2, 3, 4 + 5 + 6, 7. L'analyse du carbone 4 est obtenue par oxydation à l'acide periodique du sédoheptulosane [8]. Le dialdéhyde résultant est oxydé au brome en diacide [8] dont le sel de calcium est pyrolysé à  $500^\circ\text{C}$ , ce qui donne la radioactivité des carbones 3 + 5 et permet de compléter l'analyse.

Le tableau I rapporte les résultats correspondant à un temps d'incubation de dix secondes en présence de  $^{14}\text{CO}_2$ . Ces résultats sont exprimés en pour cent de la radioactivité totale incorporée dans chaque composé.

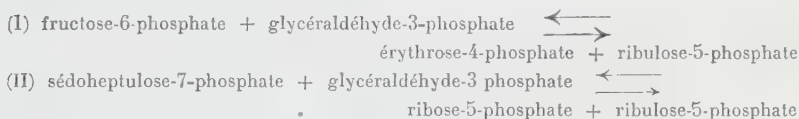
Le marquage de l'acide 3-phosphoglycérique dans le seul groupe carboxylique s'accorde avec l'hypothèse d'une carboxyla-

TABLEAU I.

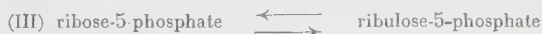
Acide 3-phosphoglycérique	Fructose-6-phosphate	Sédoheptulose-phosphate	Ribulose-diphosphate
C <sub>1</sub> 94	C <sub>1</sub> 1	C <sub>1</sub> 0	C <sub>1</sub> 10
C <sub>2</sub> 4	C <sub>2</sub> 1	C <sub>2</sub> 0	C <sub>2</sub> 10
C <sub>3</sub> 2	C <sub>3</sub> 49	C <sub>3</sub> 32	C <sub>3</sub> 80
	C <sub>4</sub> 47	C <sub>4</sub> 29	C <sub>4</sub> 0
	C <sub>5</sub> 1	C <sub>5</sub> 39	C <sub>5</sub> 0
	C <sub>6</sub> 1	C <sub>6</sub> 0	
		C <sub>7</sub> 0	

tion hydroclastique du ribulose-diphosphate sous l'effet de la carboxydismutase [9]. Le fructose-6-phosphate dont les carbones 3 et 4 contiennent chacun la moitié de la radioactivité totale du composé proviendrait du fructose-1-6-diphosphate formé par condensation des trioses-phosphates sous l'effet de l'aldolase. Enfin, les modes de marquage du sédoheptulose-phosphate et du ribulose-diphosphate s'accordent avec ceux qui résulteraient théoriquement de l'action de la transcétolase et de la transaldolase, étant donné la répartition de la radioactivité dans l'acide-3-phosphoglycérique et le fructose-6-phosphate.

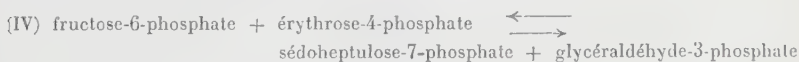
On sait, en effet, que la transcétolase [40, 41] réalise les réactions :



D'autre part, la pentose-phosphate isomérase [12] catalyse la transformation



et la transaldolase [13] réalise :



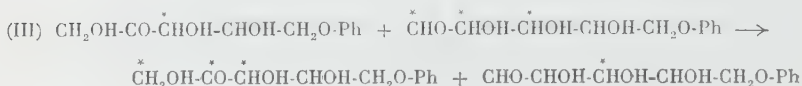
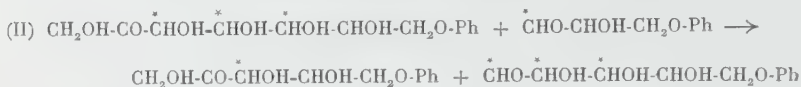
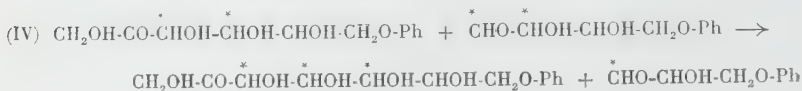
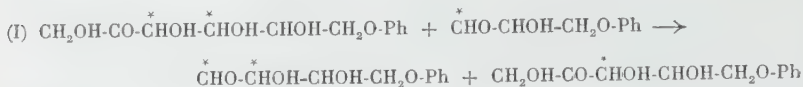
En partant d'un fructose-6-phosphate du type :



et du glycéraldéhyde-3-phosphate du type :



le marquage dans les composés formés est réparti théoriquement de la façon suivante :



de sorte que le sédoheptulose-7-phosphate formé selon IV sera du type :



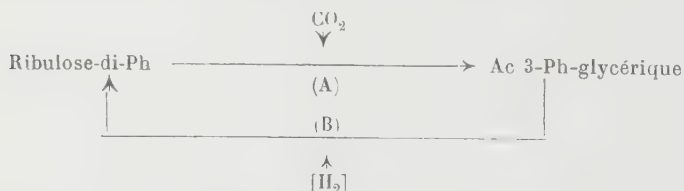
et le ribulose-diphosphate provenant du ribulose-phosphate formé selon I, II et III :



Les résultats expérimentaux s'accordent parfaitement avec le mode de marquage théorique.

#### V. — DÉMONSTRATION DE L'EXISTENCE D'UNE RELATION CYCLIQUE ENTRE LE RIBULOSE-DIPHOSPHATE ET L'ACIDE 3-PHOSPHOGLYCÉRIQUE.

Supposons que, comme dans la photosynthèse, existe un cycle d'assimilation du  $\text{CO}_2$  selon un schéma du type suivant :



On voit dans ce cas que, lorsque les réserves en ribulose-diphosphate et en acide 3-phosphoglycérique sont saturées en radio-activité, si l'on supprime la source de  $\text{CO}_2$ , le cycle est



interrompu en (A), le ribulose-diphosphate doit s'accumuler et l'acide 3-phosphoglycérique diminuer; si, au contraire, on supprime le pouvoir réducteur en supprimant la source de thio-

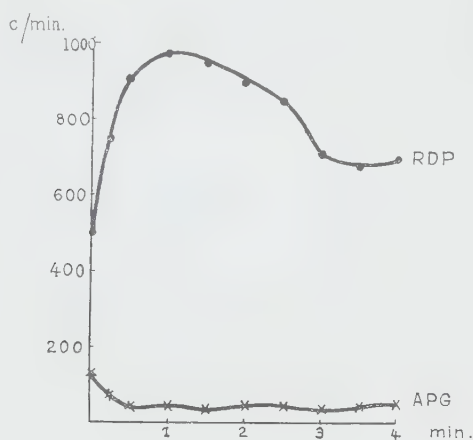


FIG. 2.

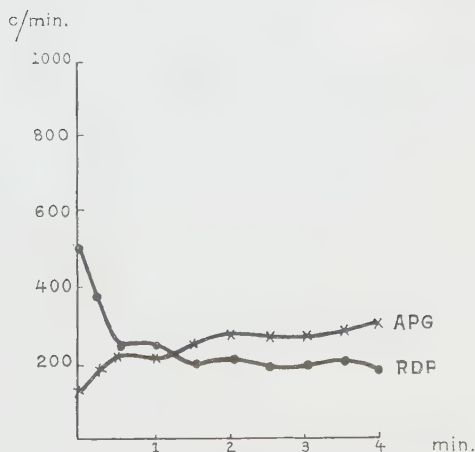


FIG. 3.

sulfate, le cycle est interrompu en (B), l'acide 3-phosphoglycérique doit s'accumuler et le ribulose-diphosphate diminuer.

Pratiquement, nous avons fait varier brusquement la concentration en  $\text{CO}_2$ , en centrifugeant des bactéries préalablement

exposées au  $^{14}\text{CO}_2$  et en les remettant en suspension dans le milieu habituel dépourvu de  $\text{CO}_2$ . De même on peut supprimer le pouvoir réducteur en centrifugeant les bactéries puis en les remettant en suspension dans le milieu habituel contenant du  $^{14}\text{CO}_2$ , mais dépourvu de thiosulfate et de nitrate. L'analyse cinétique de la radioactivité incorporée dans l'acide 3-phosphoglycérique (APG) et le ribulose-diphosphate (RDP) est représentée sur les figures 2 et 3. La figure 2 rapporte les résultats relatifs à la suppression du  $\text{CO}_2$ , la figure 3 ceux relatifs à la suppression du pouvoir réducteur.

Ces résultats montrent clairement que lorsqu'on supprime le  $\text{CO}_2$ , l'acide 3-phosphoglycérique diminue tandis que le ribulose-diphosphate s'accumule (fig. 2), tandis qu'à la suppression du pouvoir réducteur correspond aussitôt une accumulation de l'acide 3-phosphoglycérique et une diminution du ribulose-diphosphate (fig. 3). Ceci démontre l'existence d'un cycle reliant le ribulose-diphosphate à l'acide 3-phosphoglycérique.

#### CONCLUSION.

Tous ces résultats, formation de l'acide 3-phosphoglycérique comme premier produit stable de l'incorporation du  $\text{CO}_2$ , mode

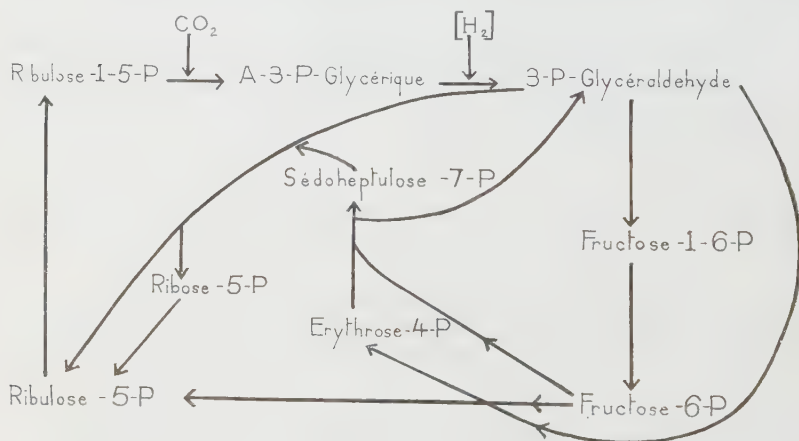


FIG. 4.

de marquage de l'acide 3-phosphoglycérique, du fructose-6-phosphate, du sédohéptulose-phosphate et du ribulose-diphosphate après dix secondes d'incubation en présence de  $^{14}\text{CO}_2$ , démonstration de l'existence d'une relation cyclique entre le ribulose-

diphosphate et l'acide 3-phosphoglycérique, permettent d'établir le schéma représenté par la figure 4, qui s'accorde également avec le travail enzymologique récent de Trudinger [14].

Ce schéma, qui fut proposé par M. Calvin et coll. [15, 16] pour expliquer le mécanisme d'assimilation du  $\text{CO}_2$  dans la photosynthèse, a donc une portée plus générale puisqu'il s'applique également à l'assimilation du  $\text{CO}_2$  dans la chimioautotrophie.

#### RÉSUMÉ.

Nous avons établi les voies d'assimilation de l'anhydride carbonique par les bactéries chimioautotrophes en nous fondant sur les résultats suivants obtenus avec *Thiobacillus denitrificans*: identification de l'acide 3-phosphoglycérique comme premier produit stable de l'incorporation du  $\text{CO}_2$ , répartition de la radioactivité dans les différents atomes de carbone de l'acide 3-phosphoglycérique, du fructose 6-phosphate, du sédoheptulose-phosphate et du ribulose-diphosphate après dix secondes d'incubation des bactéries en présence de  $^{14}\text{CO}_2$ , mise en évidence d'une relation cyclique existant entre l'acide 3-phosphoglycérique et le ribulose-diphosphate. Ce schéma est analogue à celui que Calvin a établi pour la photosynthèse.

#### SUMMARY

##### THE PATH OF $\text{CO}_2$ ASSIMILATION IN CHEMOAUTOTROPHIC BACTERIA

Based on the following results obtained with *Thiobacillus denitrificans* we have established the schemes of  $\text{CO}_2$  assimilation in chemoautotrophic bacteria:

1° Identification of 3-phosphoglyceric acid as the first stable product of  $\text{CO}_2$  incorporation.

2° Distribution of radioactivity in the carbon atoms of 3-phosphoglyceric acid, fructose-6-phosphate, sedoheptulose-phosphate and ribulose-diphosphate after 10 sec. incubation of the bacteria in presence of  $\text{C}^{14}\text{O}_2$ .

3° Demonstration of a reciprocal relation between phosphoglyceric acid and ribulose-diphosphate.

The resulting scheme is analogous to that shown by Calvin to operate in photosynthetic organisms.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] AUBERT (J.-P.), MILHAUD (G.) et MILLET (M<sup>lle</sup> J.). C. R. Acad. Sci., 1956, 242, 2059.

- [2] MILHAUD (G.), AUBERT (J.-P.) et MILLET (M<sup>lle</sup> J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **243**, 102.
- [3] AUBERT (J.-P.) et MILHAUD (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 320.
- [4] BENSON (A. A.), KAWAUCHI (S.), HAYES (P.) et CALVIN (M.). *J. amer. Chem. Soc.*, 1952, **74**, 4477.
- [5] BASSHAM (J. A.), BENSON (A. A.) et CALVIN (M.). *J. biol. Chem.*, 1950, **185**, 781.
- [6] TOPPER (Y. J.) et HASTINGS (A. B.). *J. biol. Chem.*, 1949, **179**, 1255.
- [7] KHOUVINE (Y.) et ARRAGON (G.). *Bull. Soc. Chim.*, 1941, **8**, 676.
- [8] HASKINS (W. T.), HANN (R. M.) et HUDSON (C. S.). *J. amer. Chem. Soc.*, 1952, **74**, 2198.
- [9] QUAYLE (J. R.), FULLER (R. C.), BENSON (A. A.) et CALVIN (M.). *J. amer. Chem. Soc.*, 1954, **76**, 3610.
- [10] HORECKER (B. L.) et SMYRNIOTIS (P. Z.). *Methods in Enzymology*, 1955, **1**, 371.
- [11] HABA (G. DE LA) et RACKER (E.). *Ibid.*, **375**.
- [12] HORECKER (B. L.), SMYRNIOTIS (P. Z.) et SEEGMILLER (J. E.). *J. biol. Chem.*, 1951, **193**, 383.
- [13] HORECKER (B. L.) et SMYRNIOTIS (P. Z.). *Methods in Enzymology*, 1955, **1**, 381.
- [14] TRUDINGER (P. A.). *Biochem. J.*, 1956, **64**, 274.
- [15] BASSHAM (J. A.), BENSON (A. A.), KAY (L. D.), HARRIS (A. Z.), WILSON (A. T.) et CALVIN (M.). *J. amer. Chem. Soc.*, 1954, **76**, 1760.
- [16] CALVIN (M.). In « Conférences et Rapports du III<sup>e</sup> Congrès International de Biochimie », Vaillant-Carmanne, édit., Liège, 1956, p. 221.
- [17] AUBERT (J. P.), MILHAUD (G.) et MILLET (M<sup>lle</sup> J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **244**, 398.

# ÉLECTROPHORÈSE

## DU VENIN D'ANCISTRODON RHODOSTOMA BOIE

par Henri PLAGNOL et Paul MARTIN (\*).

(Institut Pasteur de Saigon)

Les techniques d'électrophorèse sont d'un grand intérêt pour l'étude biochimique du venin des serpents, produit de nature essentiellement protidique.

Parmi les nombreux travaux que ces recherches ont suscités, citons ceux de Barrio [2], Bussard et Côté [4], Grasset et Schwartz [5], Slotta [9], Suzuki [10].

Nous avons effectué un certain nombre d'électrophorèses sur papier à l'aide du venin de la vipère *Ancistrodon rhodostoma boie*. Le venin a été prélevé sur des serpents en provenance de diverses plantations.

### Techniques.

Nous avons utilisé l'appareil de Machebœuf et Rebeyrotte en suivant la technique de Machebœuf et coll. [6]. (Papier Arches 301, 6 × 25 cm, tampon Durrum pH: 8,6, coloration par le bleu de bromophénol, méthode lente.) Les courbes ont été faites à l'aide d'un photomètre enregistreur Leres suivant la méthode indiquée par Rebeyrotte [8].

Nous ne donnons pas de résultats quantitatifs, car, même à titre indicatif, ils ne pourraient que fournir une idée fautive du pourcentage relatif réel des différentes fractions [4].

Le nombre et la répartition des fractions protidiques du venin frais et du venin sec, l'action physiologique des principales fractions, les modifications des protéinogrammes au cours du vieillissement du venin constitueront les trois parties principales de cette note.

### I. — FRACTIONNEMENT ÉLECTROPHORÉTIQUE.

a) VENIN SEC. — Le venin sec est préparé par dessiccation sous vide phosphorique.

L'électrophorèse a été pratiquée sur une prise de 2,5 mm<sup>3</sup> d'une

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 8 novembre 1956.



dilution aqueuse au dixième d'un venin sec provenant du mélange des sécrétions de 10 vipères.

La figure 1 montre le protéinogramme obtenu (bande colorée et courbe). On y relève 6 fractions : 3 fractions anodiques (1, 2 et 3) et 3 fractions cathodiques (4, 5 et 6), les fractions 2, 3, 5 et 6 étant les plus importantes.

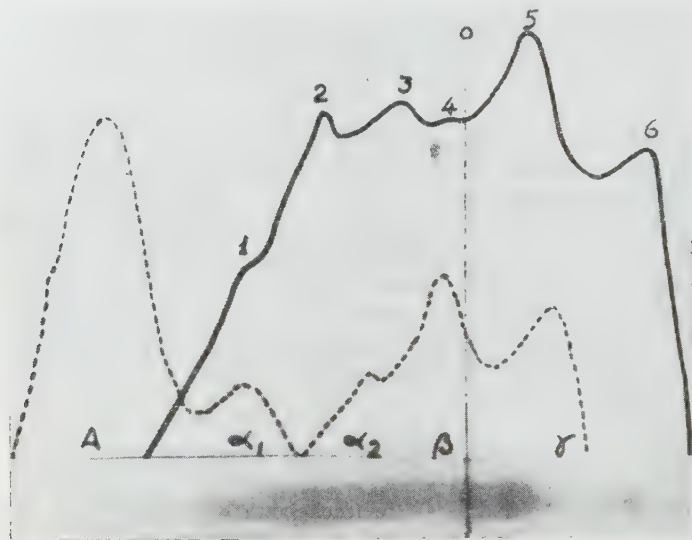


FIG. 1. — Electrophorèse du venin sec dilué au 1/10.  
 — Venin ; — — — — — Sérum humain témoin.

b) VENIN FRAIS. — 1° *Venin non dilué*. — L'électrophorèse a été faite sur une prise de 2,5 mm<sup>3</sup> du venin d'une grosse vipère, l'appareil étant enfermé dans une enceinte refroidie par de la glace.

La figure 2 montre le protéinogramme obtenu (bande colorée et courbe). Le déplacement n'est pas exactement le même que dans la figure 1, car les conditions d'évaporation sont différentes.

En comparant ce protéinogramme à celui obtenu avec le venin sec, on peut constater que les 5 fractions du venin frais correspondent aux fractions 2, 3, 4, 5 et 6 du venin sec.

2° *Venin dilué au dixième* (dans de l'eau distillée). — L'électrophorèse a été pratiquée sur 2 mm<sup>3</sup> de cette dilution, celle-ci ayant été obtenue à l'aide des venins mélangés de trois vipères.

La figure 3 montre le protéinogramme obtenu (bande colorée

et courbe). Sur ce protéinogramme, on retrouve les 6 fractions du venin sec, les principales étant les fractions 2, 5 et 6.

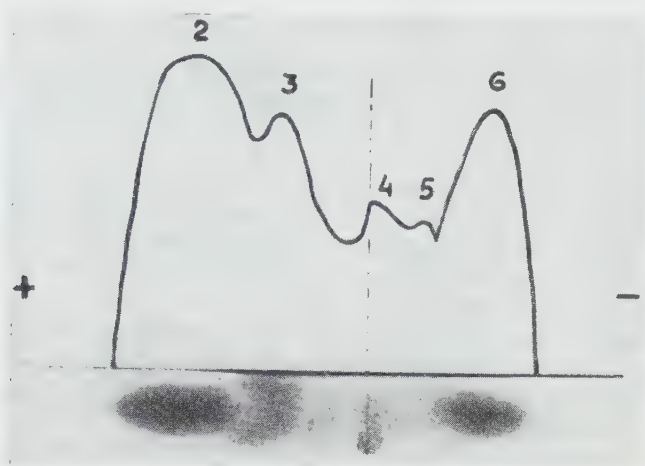


FIG. 2. — Electrophorèse du venin frais non dilué.

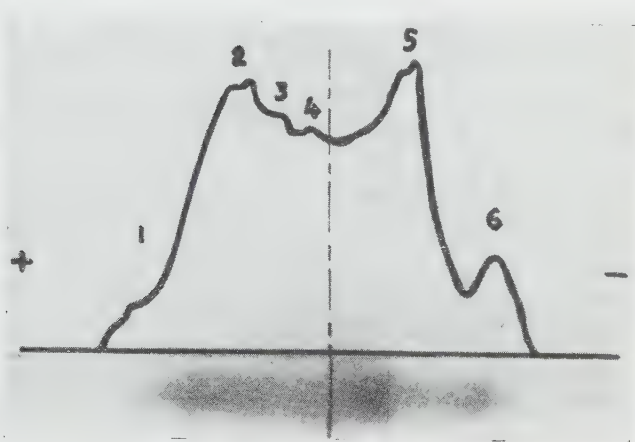


FIG. 3. — Electrophorèse du venin frais dilué au 1/10.

CONCLUSION. — L'électrophorèse sur papier permet de mettre en évidence 6 fractions protéiques dans le venin d'*Ancistrodon rhodostoma boie*. Le venin frais soumis à l'électrophorèse immédiatement après son prélèvement ne présente que 5 fractions seu-

lement, les fractions 1 et 2 étant confondues, Il y a 4 fractions principales : 2 anodiques et 2 cathodiques.

## II. — TOXICITÉ DES FRACTIONS.

Les séparations électrophorétiques pour ces expériences ont été faites en chambre froide à 5°. L'éluion des fractions a été pratiquée à l'aide de sérum physiologique thymolé (également en chambre froide).

*Première série.* — Nombre de fractions : 4 [fractions 2 (+ 1), 3, 4 + 5, 6]. Volume de chacune des fractions : 1 cm<sup>3</sup>, issues de venin frais. Animaux d'expérience : souris blanches de 20 à 23 g environ. Injection : sous-cutanée. Deux souris par fraction.

Aucun indice de toxicité.

*Deuxième série.* — Mêmes conditions d'expérience, mais solution des fractions plus concentrée (7/1 000) : injection, 1/10 de centimètre cube.

Aucun indice de toxicité.

*Troisième série.* — Mêmes conditions d'expérience. 0,5 cm<sup>3</sup> par fraction.

Aucun indice de toxicité.

*Quatrième série.* — Mêmes conditions d'expérience. 0,8 cm<sup>3</sup> par fraction.

Trois fractions seulement [fractions 2 (+ 1), 3, 4 + 5 + 6].

TABLEAU I.

15H5	2 (♦I )	3	4 ♦ 5 ♦ 6
	Tremblements très forts, poils hirsutes forte agitation, souris tournant en rond.	Légers tremblements prostration.	Pas de réaction
16H5	Paralysie du train arrière, spasmes nerveux, respiration saccadée. Mortes à 7H45 et 8H05	Pattes arrières paralysées, respiration ralentie, spasmes nerveux, entrent en agonie vers 8H, mortes à 9H et 9H15	- " -
17H5			- " -
18H5			- " -

*Dissection des deux souris ayant reçu les fractions 2 et 3 : 2 (+ 1) :* Gros placard hémorragique au site d'inoculation. Cœur et rein : caillots nombreux. Forte congestion du foie, poumons, reins et rate. Surrénales : congestion légère. Vessie bloquée

(rétention d'urine) par fort œdème. Foyers hémorragiques autour des vaisseaux. Dégénérescence granuleuse du rein et du foie.

3 : Sang incoagulable. Péritoine contenant sérosité sanguinolente. Reins et poumons laissent sourdre du sang incoagulable. Tous les organes sont légèrement congestionnés. Capillaires dilatés laissant passer les hématies. Alvéoles du poumon gorgées d'une sérosité sanglante abondante.

CONCLUSION. — A la suite d'autres auteurs [7, 44], nous avons remarqué que la toxicité totale des venins est variable suivant, principalement, la taille des serpents, mais également suivant d'autres facteurs indéterminés. Nous avons constaté que la toxicité suivait la viscosité des venins.

De même, la toxicité des fractions est également très variable. Seule la quatrième série de nos expériences nous a donné un résultat. La fraction 2 (+ 1) est neurotoxique et coagulante. La fraction 3 est anticoagulante.

### III. — MODIFICATION DES PROTÉINOGRAMMES EN FONCTION DU VIEILLISSEMENT.

Six solutions au dixième de venin sec dans de l'eau distillée ont été préparées et conservées de la manière suivante :

Solution A : à la chambre froide (environ 5°).

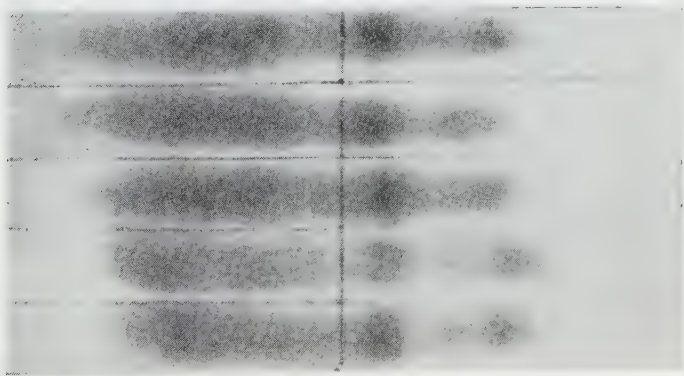


FIG. 4. — Solution de venin conservée à + 5°.

Solution B : dans une pièce climatisée (environ 25°).

Solution C : au réfrigérateur (environ 10°).

Solution D : à la température ambiante (environ 30° à 35°).

Solution E : à l'étuve à 48°.

Solution F : à l'étuve à 100°.

Les électrophorèses ont été pratiquées : deux, quatre, sept, onze, trente jours après la mise en solution.

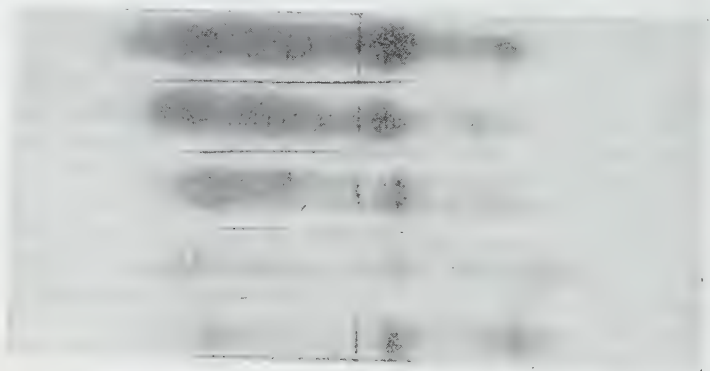


FIG. 5. — Solution de venin conservée à + 25°.

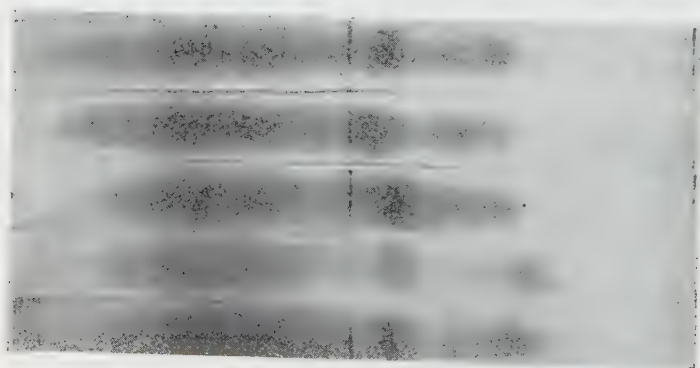


FIG. 6. — Solution de venin conservée à + 10°.

Les solutions A, B et C (fig. 4, 5 et 6) ne présentent aucune modification sensible après trente jours de conservation.

La solution D (fig. 7) commence à présenter une diminution des fractions 1 et 6 à partir du septième jour. Au vingtième jour, les fractions sont déjà difficilement discernables. Au trentième jour, les fractions ne sont plus visibles. Dans le même temps la coloration générale de la tache diminue considérablement.



La solution E (fig. 8) présente dès le deuxième jour de l'expérience une diminution des fractions 1, 5 et 6. Au quatrième jour, les fractions 4, 5 et 6 sont très diminuées. Au septième jour, seule la fraction 3 est encore nette. Au vingtième jour, le protéi-

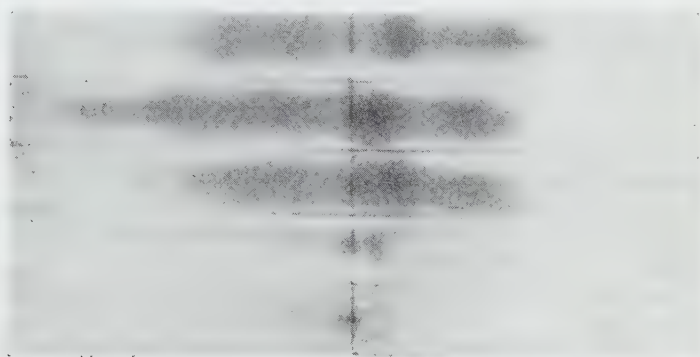


FIG. 7. — Solution de venin conservée à  $+30-35^{\circ}$ .

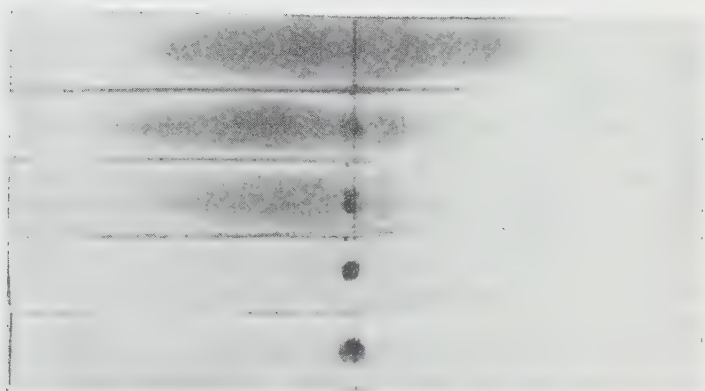


FIG. 8. — Solution de venin conservée à  $+48^{\circ}$ .

nogramme n'est que très faiblement visible. Au trentième jour, il n'y a plus qu'une tache au point de départ.

La solution F est coagulée dès le deuxième jour.

CONCLUSION. — Une température de  $100^{\circ}$  dénature immédiatement les protéines du venin.

A 48°, la dénaturation est pratiquement totale au vingtième jour.

A 30-35°, la dénaturation est très avancée au trentième jour.

Les premières modifications des protéinogrammes se manifestent à partir du septième jour à la température ordinaire et à partir du deuxième jour à 48°. Ce sont les fractions 1 et 6 qui sont les premières touchées.

#### RÉSUMÉ.

L'électrophorèse sur papier du venin de la vipère *Ancistrodon rhodostoma boie* donne, dans nos conditions d'expérience, un protéinogramme présentant 6 fractions pour le venin sec ou frais dilué, 5 pour le venin frais soumis au fractionnement immédiatement après son prélèvement.

La fraction 1 + 2 est neurotoxique et coagulante, la fraction 3 anticoagulante.

La conservation des solutions de venin à des températures inférieures à 25° n'apporte aucune modification du protéinogramme pendant trente jours. A température supérieure, le vieillissement est plus ou moins rapide et il porte en premier lieu sur les fractions 1 et 6.

#### SUMMARY

##### ELECTROPHORESIS OF *Ancistrodon rhodostoma boie* VENOM

By paper-electrophoresis it has been possible to obtain six fractions from the venom of *Ancistrodon rhodostoma boie* when dried or fresh and diluted, and five fractions from the fresh venom when fractionated immediately after it is taken.

Fraction 1 + 2 is neurotoxic and coagulating; fraction 3 is anti-coagulating.

When preserved at temperatures below 25°, the solutions of venom are not modified for 30 days. At higher temperatures, the aging is more or less rapid and affects first fractions 1 and 6.

#### Annexe.

##### CARACTÈRES GÉNÉRAUX DU VENIN D'*Ancistrodon rhodostoma*.

*Consistance* : plus ou moins fluide.

*Coloration* : jaune or à jaune sale.

*Goût et odeur* : nulles à la récolte.

*Quantité de venin par serpent :*

Minimum : 0,050 g (serpent de 0,40 m de long).

Maximum : 0,900 g (serpent de 0,95 m de long).

## COMPOSITION CHIMIQUE.

TABLEAU II.

	Venin frais en g p. 100 cm <sup>3</sup>	Venin sec en g p. 100 g
Densité .....	1 057	
Humidité .....	59,19	10,7
Protides totaux .....	34,8	87,2
Albumine .....	28,4	77,7
Globulines .....	6,4	9,5
Rapport A/G .....	4,4	8,1
Lipides .....		0,35
Glucides réducteurs.....		traces
Cendres .....	1,280	2,637
Sodium .....	0,416	0,612
Potassium .....	0,120	0,245
Calcium .....	0,133	0,875
Insoluble	de 7 à 20 %	15,4 %

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] AZERAD (E.), LEWIN (J.) et GHATA (J.). *Presse méd.*, 1956, **64**, 717.
- [2] BARRIO (A.). *Rev. Inst. Malbran*, 1954, **16**, 215.
- [3] BOQUET (P.). *Ann. Biol. clin.*, 1948, **24**, 275.
- [4] BUSSARD (A.) et CÔTÉ (R.). *C. R. Acad. Sci.*, 1954, **239**, 915.
- [5] GRASSET (E.) et SCHWARTZ (D. E.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 271.
- [6] MACHEBOEUF (M.), REBEYROTTE (P.), DUBERT (J.-M.) et BRUNERIE (M<sup>lle</sup> M.). *Microélectrophorèse sur papier. Techniques et applications*. Lib. Autin, édit., Paris, 1954.
- [7] MINTON (S. A.). *Copeia*, U. S. A., 1953, n° 4, 212.
- [8] REBEYROTTE (P.). *Ann. Biol. clin.*, 1955, **13**, 408.
- [9] SLOTTA (K.). *Experientia*, 1953, **9**, 81.
- [10] SUZUKI (I.) et coll. *J. Pharm. Soc. Japan*, 1954, **74**, 167.
- [11] ZELLER (A.). *Adv. Enzymol.*, 1948, **8**, 459.

# FACTEURS DE LA FORMATION DES CONIDIES EN MILIEU AGITÉ CHEZ *PENICILLIUM CASEICOLUM* BAINIER

par Faridun BHARUCHA (\*) (\*\*) (\*\*\*)

(Institut Pasteur, Service des Fermentations)

La formation des conidiophores, chez *Penicillium* comme chez d'autres Aspergillacées, a surtout été étudiée dans des cultures sur milieu gélosé, ou sur milieu liquide stationnaire [1, 2, 3, 4, 5].

En voyant dans ces cultures les conidiophores dressés à la surface des mycéliums, on pourrait penser que ce sont nécessairement des formations aériennes.

Mais vers 1945, pour la production de la pénicilline, des cultures « immergées » de *Penicillium notatum* ont été réalisées, soit en flacons agités, soit en cuves munies d'un appareillage d'aération et d'agitation. Or, Foster, Mc Daniel, Woodruff et Stokes en 1945 [6], puis Gilbert et Hickey en 1946 [7], ont constaté que, pour certaines conditions de milieu, des conidiophores se forment dans les cultures immergées.

Nous avons repris avec *P. caseicolum* l'étude des facteurs de la formation des conidiophores en milieu liquide agité, chimiquement défini.

Nous montrons que l'apparition des conidiophores n'est pas liée à l'épuisement de l'aliment carboné ou de l'aliment azoté dans le milieu au cours de la culture, mais qu'elle est déterminée par le pH initial du milieu. Nous mettons en relation l'effet observé avec la nutrition azotée du champignon à divers pH initiaux.

(\*) Manuscrit reçu le 20 novembre 1956.

(\*\*) Adresse actuelle : Alembic Chemical Works, Baroda, Inde.

(\*\*\*) L'auteur veut exprimer sa gratitude à M. le professeur Lemoigne qui l'a accueilli dans son service et à M. N. Grelet pour les conseils qu'il en a reçus au cours du travail.

## MÉTHODES ET TECHNIQUES.

*Souche* : Nous avons utilisé la souche de *Penicillium caseicolum* Bainier [*P. candidum* Link] (1) du Service de la Laiterie de l'Institut Pasteur.

*Milieu de conservation* : La souche est conservée sur bouillon de haricot gélosé.

*Milieu liquide chimiquement défini* : Nous nous sommes inspiré de la publication de Jarvis et Johnson [8] pour la composition minérale du milieu.

Notre milieu témoin, où le glucose est la seule source carbonée et le nitrate la seule source azotée, a la composition suivante en millimolécules par litre :

Glucose, 250 ;  $\text{NO}_3\text{K}$ , 100 ;  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ , 50 ;  $\text{SO}_4\text{Na}_2$ , 5 ;  $\text{SO}_4\text{Mg}$ , 1,0 ;  $\text{SO}_4\text{Zn}$ , 0,1 ;  $\text{SO}_4\text{Mn}$ , 0,1 ;  $(\text{SO}_4)_3\text{Fe}_2$ , 0,25 ;  $\text{SO}_4\text{Cu}$ , 0,02 ;  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , 5. Le pH initial est ajusté à 5,0 par addition de 3,05 cm<sup>3</sup> de KOH, N par litre, ou à 3,0 par addition de 2,4 cm<sup>3</sup> de  $\text{SO}_4\text{H}_2$ , N par litre.

Parmi les additions que nous avons apportées au milieu, nous signalons l'hydrolysât de caséine « privé de vitamines » préparé selon Clegg, Kodicek et Mistry 1952 [9].

*Conditions d'ensemencement et de culture* : Toutes les cultures ont été effectuées à la température de 24° C en milieux liquides aérés par agitation. Les flacons d'Erlenmeyer de 1 l contenant 100 ml de milieu sont fixés sur un agitateur rotatif (240 tours par minute ; excentricité, 35 mm).

Avec une suspension de conidies formées à la surface d'une culture de 14 jours, sur milieu gélosé, on ensemence une culture en milieu chimiquement défini à pH initial 4,0. Après deux jours d'agitation, les conidies ont germé et un mycélium végétatif abondant s'est développé.

Avec cette culture préalable, désignée comme « inoculat », on ensemence les milieux à comparer, à raison de 5 ml pour 100 ml.

Les résultats sont ainsi plus reproductibles que lorsqu'on ensemence directement les milieux à comparer avec la suspension de conidies.

Les cultures sont poursuivies quatre jours au moins, et des prélèvements sont faits chaque jour pour examen microscopique, mesure du pH, dosage du glucose ; dans certains cas, le poids sec de mycélium a été déterminé à la fin de la culture.

## RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

I. EFFET DU pH INITIAL DU MILIEU. — Nous avons d'abord constaté que le milieu chimiquement défini, à pH initial 5,8, permet un développement satisfaisant de la culture, avec apparition au deuxième jour d'un grand nombre de conidiophores.

(1) Nous remercions M<sup>me</sup> Nicot, assistante au Laboratoire de Cryptogamie au Muséum de Paris, qui a eu l'amabilité de préciser, dans la nomenclature actuelle des *Penicillia*, l'identification de cette souche, habituellement désignée par *P. candidum*.



Nous avons alors cherché quelle modification il convient d'apporter à ce milieu pour retarder ou empêcher la formation des conidiophores, sans toutefois limiter la croissance de la culture.

Ce résultat a été atteint lorsque nous avons abaissé suffisamment le pH initial du milieu.

Le milieu a été additionné de potasse ou d'acide sulfurique, de façon que les pH initiaux après ensemencement avec l'inoculat végétatif aient les valeurs suivantes : 2,2, 3,0, 3,5, 4,2, 5,0, 5,2 et 5,4 (tableau I).

TABLEAU I. — Effet du pH initial entre 2,2 et 5,4.

MILIEU	EXAMEN	DUREE DES CULTURES (JOURS)				
		0	1	2	5	4
1	pH	2,2	2,5	2,6	2,6	5,5
	P	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-
	gluc.	42,8	-	42,6	-	34,4
2	pH	3,0	3,0	5,5	6,6	7,0
	P	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-
	gluc.	42,8	-	36,4	-	4,40
3	pH	3,5	3,9	6,2	6,7	6,7
	P	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-
	gluc.	43,6	-	31,6	-	3,2
4	pH	4,2	5,5	6,1	6,5	7,1
	P	-	-	(+)	+	++
	C	-	-	-	-	(+)
	gluc.	40,4	-	36,0	-	16,4
5	pH	5,0	5,6	5,9	6,4	6,8
	P	-	-	++	+++	+++
	C	-	-	+	+	++
	gluc.	41,2	-	36,8	-	24,8
6	pH	5,2	5,8	6,0	6,5	6,9
	P	-	-	++++	++++	++++
	C	-	-	+	++	+++
	gluc.	44,8	-	36,8	-	21,2
7	pH	5,4	6,0	6,2	6,6	6,8
	P	-	-	++++	++++	++++
	C	-	-	+	++	+++
	gluc.	44,0	-	36,8	-	17,2

P = conidiophores (pinceaux) ; C = conidies libres ; gluc. = glucose en g/l restant dans le milieu. La signification des — et des + résulte des cas limites suivants : — : on ne trouve pas de conidiophores ou de conidies ; (+) : il faut regarder de nombreux champs au grossissement  $\times 180$  pour trouver un conidiophore ou une conidie libre ; ++++ : on trouve un très grand nombre de conidiophores ou de conidies dans un même champ (voir par exemple fig. 2, b).

Dans les cultures dont le pH initial est égal ou inférieur à 3,5, les prélèvements des quatre premiers jours n'ont pas montré de conidiophores ; dans d'autres expériences, on a vu parfois au

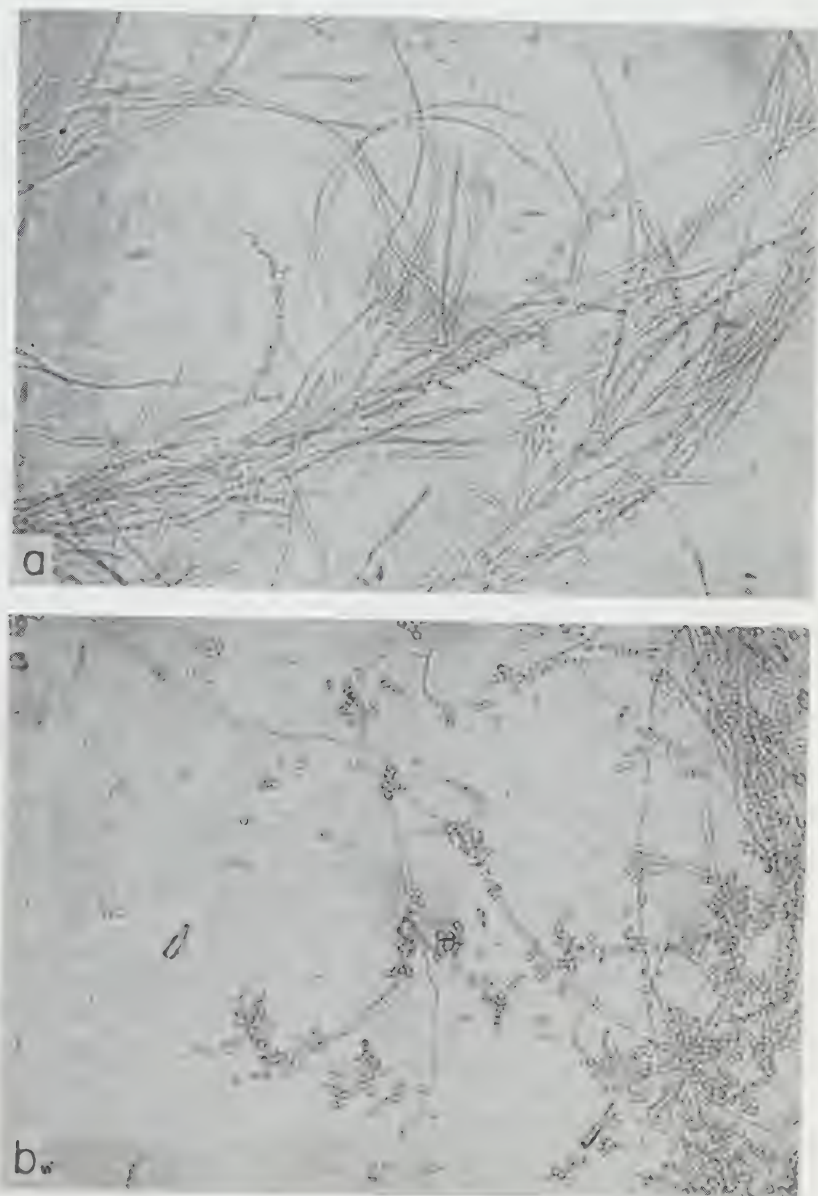


FIG. 1. — Cultures de 3 jours de *Penicillium caseicolum*. Ensemencement avec un inoculat végétatif : a) pH initial, 3,2 ; pH au troisième jour, 7,4 : rares conidiophores ; b) pH initial, 5,0 ; pH au troisième jour, 6,6 : conidiophores et conidies. Grossissement :  $\times 180$ .

troisième ou au quatrième jour quelques rares conidiophores, comportant peu de stérigmates et formant peu de conidies (fig. 1 a).

Au contraire, dans les cultures dont le pH initial est égal ou supérieur à 4,2, les conidiophores apparaissent dès le deuxième jour, en nombre d'autant plus grand que le pH initial est plus élevé ; les jours suivants, ils deviennent très nombreux, très fournis et libèrent beaucoup de conidies (fig. 1 b).

Des numérations de conidies, faites à la cellule de Malassez, sur deux cultures homogénéisées mécaniquement, ont donné :

1 670 000 conidies/ml dans la culture à pH initial 4,2 ;

14 500 000 conidies/ml dans la culture à pH initial 5,4.

L'évolution des cultures en fonction du pH initial appelle d'autres observations.

Le pH initial 2,2 est trop bas pour permettre une croissance immédiate ; ce n'est qu'au quatrième jour qu'une partie notable du glucose a disparu et que le pH s'est élevé à 5,5.

Avec les cultures dont le pH initial est 3,0 et 3,5, la croissance est rapide et le glucose est presque épuisé au quatrième jour.

Avec les cultures dont le pH initial est égal ou supérieur à 4,2, la croissance est d'abord aussi rapide, puis paraît se ralentir, de sorte qu'au quatrième jour, il reste environ 20 g/l de glucose inutilisé sur 45 g/l initialement (250 mM).

Ainsi, dans les cultures où se forment les conidiophores, le glucose demeure en excès ; nous avons vérifié que le nitrate (initialement 100 mM) demeure également en excès.

Dans des milieux contenant une quantité limitée de glucose (25 mM), ou de  $\text{NO}_3\text{K}$  (10 mM), la formation des conidiophores ne dépend encore que du pH initial : elle n'est ni empêchée ni favorisée par l'épuisement du glucose ou du nitrate.

Soulignons enfin que, dans les cultures à pH initial égal ou supérieur à 3,0, les pH se sont égalisés au voisinage de 6,0, au deuxième jour, au moment où l'examen microscopique révèle de grandes différences dans l'évolution des cultures.

Le problème se trouve donc posé de savoir comment le pH initial du milieu peut exercer un tel effet sur la formation ultérieure des conidiophores.

**II. SÉPARATION ET RECOMBINAISON DU MYCÉLIUM ET DU MILIEU SURNAGEANT DE JEUNES CULTURES A DIVERS pH.** — Nous nous sommes demandé si l'agent qui entraîne la formation des conidiophores dans la culture à pH initial 5,0 est présent dans le milieu de culture, ou dans le mycélium lui-même.

Avec un inoculat de deux jours, on ensemence deux milieux, l'un à pH initial 3,0 et l'autre à pH initial 5,0.

Après vingt-quatre heures d'agitation, les cultures sont centrifugées à froid. On obtient ainsi deux surnageants  $S_3$  et  $S_5$ , pro-

venant des cultures dont les pH, initialement à 3,0 et 5,0, se sont égalisés à 5,7, et deux culots  $C_3$  et  $C_5$  qui sont lavés deux fois avec un tampon de phosphate 50 mM à pH 5,0.

Une moitié du culot  $C_3$  est ajoutée à 100 ml du surnageant  $S_5$  ; l'autre moitié est ajoutée à 100 ml de milieu neuf  $M_5$  à pH initial 5,0.

Une moitié du culot  $C_5$  est ajoutée à 100 ml du surnageant  $S_3$  ; l'autre moitié est ajoutée à 100 ml de milieu neuf  $M_5$ .

Les flacons sont alors remis à agiter pendant quatre jours supplémentaires.

Les cultures formées avec le culot  $C_3$  remis en suspension dans  $S_5$  ou  $M_5$  donnent tardivement des conidiophores peu nombreux.

Au contraire, les cultures formées avec le culot  $C_5$  remis en suspension dans  $S_3$ , forment de nombreux conidiophores, dans les mêmes délais que la culture à pH initial 5,0 non centrifugée.

Ainsi le surnageant  $S_3$  ne contient pas de facteur qui favorise la formation des conidiophores ; et le surnageant  $S_5$  ne contient pas de facteur qui l'inhibe.

C'est donc le mycélium lui-même qui est orienté vers l'une ou l'autre évolution, dans la phase précoce de la croissance qui se déroule à un pH voisin du pH initial.

III. EFFET DE DIVERSES SOURCES AZOTÉES. — 1° Lorsqu'on remplace dans le milieu le nitrate par le sulfate d'ammonium, le pH, au lieu de s'élever, s'abaisse au cours de la culture par suite de l'assimilation du cation  $NH_4$ .

Dans un milieu à pH initial 7,0, contenant 22,5 mM de sulfate d'ammonium, on fait un inoculat de deux jours, avec lequel on enseme un milieu de même composition, et on suit l'évolution de cette culture : au deuxième jour, les conidiophores apparaissent, alors que le pH est à 6,2 ; les jours suivants, le pH s'abaisse jusqu'à 3,5 et on voit de très nombreuses conidies libres.

Ainsi, la formation des conidiophores dans un milieu dont le pH initial est suffisamment élevé, n'est pas empêchée par la présence d'ammoniaque comme source azotée.

2° Au contraire, lorsque, dans un milieu à pH initial 5,8, le nitrate est remplacé par la peptone (5 g/l), les conidiophores n'apparaissent pas pendant les huit jours où des échantillons ont été prélevés.

Il en est de même avec une quantité d'hydrolysate de caséine « privé de vitamines », qui apporte au milieu 100 milliéquivalents d'azote.

3° Avec l'acide L(—) aspartique (50 mM), la croissance est interrompue pendant plusieurs jours, mais le mycélium apporté par l'ensemencement forme de nombreux conidiophores.

4° Avec l'acide L(+) glutamique (50 mM), la croissance est

rapide et le poids sec au septième jour est le double de celui obtenu dans le milieu témoin avec du nitrate. Pourtant, des conidiophores se forment, en nombre seulement un peu moindre que dans le milieu témoin.

5° Avec la L(+) alanine (50 mM), le poids sec au septième jour est plus du double de celui obtenu dans le milieu avec le nitrate. Mais il ne se forme pas de conidiophores.

L'alanine a donc le même effet que la peptone ou l'hydrolysât de caséine.

6° Nous avons essayé de remplacer l'alanine par l'acide pyruvique (50 mM) en présence de sulfate d'ammonium (25 mM) dans le milieu à pH initial 5,8. Il se forme des conidiophores entre le deuxième et le quatrième jour, avant que ne se produise une acidification qui abaisse le pH à 3,0 au sixième jour.

L'acide pyruvique n'exerce donc pas le même effet que l'alanine.

IV. PASSAGES EN SÉRIE DANS DES MILIEUX A pH INITIAL 3,0 OU 5,0, EN ABSENCE D'ALANINE. — Les différences que nous avons mises en évidence dans les cultures sur divers milieux peuvent être rendues plus manifestes au cours de passages en série.

Comme nous l'avons déjà indiqué, nous avons d'abord préparé une culture de deux jours en milieu à pH initial 4,0 avec nitrate sans alanine, ensemencé avec une suspension de conidies : ce premier passage est commun à toutes les séries.

Puis de deux jours en deux jours, on ensemence 100 ml de milieu avec 5 ml de la culture précédente.

1° Dans la série à pH initial 3,0, sans alanine, les cultures successives donnent, après cinq jours, des poids secs du même ordre :

Deuxième passage : 11,7 mg/ml ; troisième passage : 11,8 mg/ml ; quatrième passage : 12,7 mg/ml ; cinquième passage : 12,7 mg/ml.

Les conidiophores n'apparaissent pas dans les quatre premiers jours de la culture du deuxième passage. Aux passages suivants, il en apparaît quelques-uns vers le troisième ou le quatrième jour.

2° Dans la série à pH initial 5,0, sans alanine, les cultures successives de cinq jours sont de plus en plus pauvres :

Deuxième passage : 8,6 mg/ml ; troisième passage : 4,9 mg/ml ; quatrième passage : 2,9 mg/ml.

Après le deuxième passage, le mycélium se fragmente en petites pelotes qui croissent très lentement. Au microscope, on observe de très nombreux conidiophores et des conidies qui ne paraissent pas germer au cours des passages successifs.

3° Dans la série à pH initial 5,0, en présence de 50 mM d'alanine, la croissance se maintient abondante au cours des passages successifs ; les poids secs après cinq jours sont les suivants :



Deuxième passage : 20,8 mg/ml ; troisième passage : 20,3 mg/ml ; quatrième passage : 19,1 mg/ml.

Au second passage, de très rares conidiophores apparaissent au quatrième jour. Aux passages suivants, ils se forment plus précocement et le nombre des conidies libres augmente, bien qu'il reste dans le milieu un gros excès d'acide aminé qui ne suffit donc pas à inhiber totalement la formation des conidiophores.

En résumé, les passages en série, dans les conditions que nous avons définies, sont possibles avec le milieu à pH initial 3,0, mais non avec le milieu à pH initial 5,0, lorsque le nitrate est la seule source azotée. L'addition d'alanine dans le milieu à pH initial 5,0 a pour effet d'augmenter beaucoup la croissance, de permettre les passages en série et de réduire considérablement le nombre des conidiophores formés.

#### DISCUSSION.

Un problème s'est trouvé posé lorsque nous avons observé que, avec notre souche de *P. caseicolum*, une culture à pH initial 3,0 ne forme pas ou forme peu de conidiophores, alors qu'une culture à pH initial 5,0 en forme beaucoup.

Gilbert et Hickey [7] ont bien indiqué que les pH qui permettent la sporulation chez *P. notatum*, sont compris entre 5,0 et 6,5.

Mais dans notre cas, au moment où se manifestent les évolutions divergentes des cultures, les pH se sont égalisés au voisinage de 6,0. C'est donc la phase précoce de la croissance, lorsque le pH est proche du pH initial, qui est déterminante.

Nous faisons l'hypothèse que certaines synthèses nécessaires au champignon sont plus rapides à pH 3,0 qu'à pH 5,0. Dans la culture à pH initial 5,0 il se créerait ainsi, dans la phase précoce, des carences partielles qui provoqueraient la formation des conidiophores et ralentiraient la croissance.

Dans un travail sur *Acetobacter suboxydans*, Hall, Tiwari et Walker, 1952 [10], ont ainsi montré l'influence du pH sur les besoins nutritifs de la bactérie : dans un milieu glucosé, le besoin d'alanine passe d'essentiel à stimulant lorsque le pH passe de 5,0 à 5,3 ; et dans un milieu contenant du glycérol, la valine n'est pas essentielle à pH 5,0 et l'est à pH 5,3.

Pour notre souche de *P. caseicolum*, la culture est possible au premier passage dans un large intervalle du pH initial, avec le nitrate comme seule source azotée.

Mais des passages en série à pH initial 5,0 mettent en évidence le besoin partiel d'une source d'azote aminé, en particulier l'alanine.

Le fait que la présence d'alanine ne suffise pas à empêcher

la formation de quelques conidiophores après plusieurs passages et ne permette pas indéfiniment une croissance purement végétative, suggère que d'autres constituants sont eux aussi insuffisamment synthétisés lorsque le pH initial est 5,0, et deviennent à leur tour limitants.

#### CONCLUSIONS.

*Penicillium caseicolum* Bainier (*P. candidum* Link) est cultivé dans un milieu liquide agité, chimiquement défini.

Dans le milieu contenant le glucose comme source carbonée et le nitrate comme source azotée, pour un pH initial inférieur à 4,5, les conidiophores ne se forment pas, ou ne se forment qu'en petit nombre et tardivement; pour un pH initial supérieur à 4,5, les conidiophores se forment en grand nombre et précocement.

Le glucose et le nitrate ne sont pas épuisés dans le milieu lorsque les conidiophores apparaissent.

L'orientation vers la formation des conidiophores n'est pas liée aux produits du métabolisme dans le milieu, mais est conférée au mycélium durant les stades précoces de la croissance pendant lesquels le pH est au voisinage du pH initial.

Lorsqu'on remplace le nitrate par une autre source d'azote dans le milieu à pH initial suffisamment élevé, l'ammoniaque n'empêche pas la formation des conidiophores, tandis que la peptone ou l'hydrolysât de caséine l'empêchent.

Parmi les acides aminés, l'acide aspartique ou l'acide glutamique ne l'empêchent pas, tandis que l'alanine l'empêche. Cet effet de l'alanine n'est pas produit par l'acide pyruvique en présence d'ammoniaque.

Des passages en série aux divers pH, en présence ou en absence d'alanine, suggèrent que l'alanine, et sans doute d'autres acides aminés, sont synthétisés en quantité suffisante à pH voisin de 3,0, en quantité limitante à pH voisin de 5,0, et que la formation des conidiophores peut être due à cet effet limitant.

#### SUMMARY

##### FACTORS OF CONIDIA FORMATION BY *Penicillium caseicolum* BAINIER IN AGITATED MEDIUM

In a medium containing glucose as a source of carbone and nitrate as a source of nitrogen, with a pH lower than 4,5, there is no formation or a very poor and late formation of conidiophores.

Glucose and nitrate are not all consumed in the medium when conidiophores appear.

When nitrate is replaced by another N source in a medium with a high enough pH,  $\text{NH}_3$  does not prevent the formation of conidiophores, whereas peptone or caseine hydrolysate do so.

Aspartic and glutamic acids do not prevent this formation; alanin prevents it.

Serial transfers at various pH, in presence or in absence of alanin, suggest that alanin, and probably other amino-acids, are synthesized in a sufficient quantity at about pH 3, in a limiting quantity at about pH 5, and that conidiophores formation may be related with this limiting effect.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] MOYER (A. J.) et COGHILL (R. D.). *J. Bact.*, 1946, **51**, 57.
- [2] GAILEY (F. B.), STEFANIAK (J. J.), OLSON (B. H.) et JOHNSON (M. J.). *J. Bact.*, 1946, **52**, 129.
- [3] FRANK (M. C.), CALAM (C. T.) et GREGORY (P. H.). *J. gen. Microbiol.*, 1948, **2**, 70.
- [4] ARIMA (K.), TANAKA (K.) et MASUDA (K.). *J. Antib. Jap.*, 1951, **3**, 493.
- [5] MARAVALTHAS (N.). *Arg. Biol. e Tecnol.*, 1951, **5-6**, 79.
- [6] FOSTER (J. W.), Mc DANIEL (L. E.), WOODRUFF (H. B.) et STOKES (J. L.). *J. Bact.*, 1945, **50**, 365.
- [7] GILBERT (W.) et HICKEY (R. J.). *J. Bact.*, 1946, **51**, 731.
- [8] JARVIS (F. G.) et JOHNSON (M. J.). *J. am. Chem. Soc.*, 1947, **69**, 3010.
- [9] CLEGG (K. M.), KODICEK (E.) et MISTRY (S. P.). *Biochem. J.*, 1952, **50**, 326.
- [10] HALL (A. N.), TIWARI (K. S.) et WALKER (T. K.). *Biochem. J.*, 1952, **51**, XXXVI.

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE  
(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15<sup>e</sup>.)

Séance du 7 Février 1957

Présidence de M. PRÉVOR

---

COMMUNICATIONS

**PASTEURELLA NOVICIDA, sp. nov.  
NE CONSTITUE-T-ELLE PAS UNE VARIÉTÉ DE  
PASTEURELLA TULARENSIS?**

par Georges GIRARD et Jean GALLUT

(Institut Pasteur)

C. L. Larson, W. Wicht et W. Jellison, du Laboratoire des Montagnes Rocheuses, ont isolé en 1950 d'un échantillon d'eau prélevé dans l'Etat d'Utah un microorganisme dont ils font une espèce nouvelle, malgré les analogies qu'il présente avec l'agent de la tularémie, *Pasteurella tularensis*, comme l'atteste le titre même de leur travail : « A new organism resembling *P. tularensis* isolated from water » [1]. Ils proposent de le dénommer *Pasteurella novicida* sp. nov.

Nous avons procédé à une étude de ce germe (1) qui, pour nous, serait plutôt une variété de *P. tularensis* qu'une espèce nouvelle de pasteurelle. Nous en donnons les raisons dans cette note.

LES CIRCONSTANCES DE LA DÉCOUVERTE DE « *P. NOVICIDA* ». — Larson et coll. rappellent que la présence de *P. tularensis* a été démontrée dans l'eau de certaines rivières ou torrents dans les Etats du nord-ouest des Etats-Unis, ainsi qu'au Canada où des épizooties affectent des rongeurs aquatiques — castors et rats musqués (*Ondatra zibethica*) — qui sont les agents de cette contamination. C'est précisément dans un échantillon d'eau prélevé dans un tel secteur que le nouveau microbe fut isolé en 1950 à la suite de l'injection intrapéritonéale de cette eau à des

(1) Nous exprimons notre vive gratitude au Dr W. Jellison à qui nous sommes redevables de l'envoi de cette souche.

cobayes et à des souris blanches. Les animaux moururent après quelques jours avec les lésions habituelles de la tularémie et l'agent causal fut obtenu en culture pure de leur sang et de leurs viscères ensemencés sur le milieu de Francis. Or, depuis 1950, il a été impossible aux auteurs de l'identifier à nouveau dans les eaux de cette région, pas plus que chez les rongeurs dans la nature ou chez ceux inoculés avec des souches authentiques de *P. tularensis* entretenues dans leur laboratoire. Ils estiment en conséquence qu'il n'y a pas eu de confusion sur l'origine de ce microbe et qu'il provient bien de l'eau reçue en 1950. Nous tirerons argument de cette donnée épidémiologique pour justifier notre point de vue.

CARACTÈRES DISTINCTIFS DE « *P. TULARENSIS* » ET DE « *P. NOVICIDA* » (d'après Larson et coll.). — Si la morphologie, l'aspect des cultures, les exigences nutritives et le pouvoir pathogène expérimental sont analogues chez les deux microorganismes, ceux-ci se différencient par leurs caractéristiques immunologiques. Ainsi les suspensions formolées de *P. novicida* sont agglutinées par un sérum préparé avec le germe homologue, mais non avec des sérums préparés avec les organismes hétérologues. Ces divers sérums furent testés en vue de la recherche des précipitines vis-à-vis de *P. novicida* : l'antigène de *P. novicida* ne réagit pas avec les sérums de lapins immunisés avec *P. pseudotuberculosis* et *P. multocida*, mais réagit avec les sérums spécifiques *non dilués* antipesteux et antitularémique ; avec le sérum homologue, le titre est de 1/32. Enfin, *P. novicida* fait fermenter le saccharose à l'instar des pasteurelles *sensu stricto*, alors que ce glucide n'est pas attaqué par *P. pestis*, *P. pseudotuberculosis*, *P. tularensis*.

RECHERCHES PERSONNELLES. — Notre objectif tendait essentiellement à rechercher les caractères qui nous autoriseraient à étayer l'hypothèse envisagée *a priori* sur le plan épidémiologique d'une affinité entre *P. novicida* et *P. tularensis*. Nous confirmons dans ses grandes lignes le point de vue des auteurs américains quant à la morphologie, l'aspect des cultures et le pouvoir pathogène expérimental de *P. novicida* sur la souris, le hamster et le cobaye. Nous avons en particulier noté chez les souris un aspect de la rate que nous n'avions remarqué jusqu'alors que dans la tularémie et sur lequel l'attention ne semble pas avoir été attirée : l'absence de congestion, la consistance ferme de l'organe presque exsangue, sa coloration rose saumon, caractères qui s'opposent à la couleur foncée et à la diffluence des rates congestives de souris succombant à une infection septicémique comme la peste (2). Au sujet des exigences nutritives de *P. novicida*, nous les trouvons toutefois moins rigoureuses que Larson et coll., car ensemencé largement, il est vrai, le microbe nous a donné des cultures grêles, mais nettes, sur gélose peptonée (peptone PTV).

La vitalité des cultures de *P. novicida*, comme celles de *P. tularensis*,

(2) Les recherches histopathologiques en cours de notre collègue J. Levaditi préciseront la nature des lésions de la rate des souris infectées par *P. tularensis* et *P. novicida* comparées à celles qui suivent l'infection par *Pasteurella sensu stricto*.



disparaît après quelques jours en milieu liquide ou solide si elles sont maintenues à la température du laboratoire ; elle persiste par contre pendant plusieurs semaines à la glacière, se montrant plus fragile peut-être que celle des cultures de *P. tularensis*. C'est le contraire que l'on observe avec *Pasteurella* « *sensu stricto* », conservée de préférence à la température ordinaire, du moins pour la plupart des souches de *P. multocida* que nous avons étudiées.

Sur le plan immunologique, nos investigations n'ont pas eu l'ampleur de celles de nos collègues américains. Nous avons noté l'absence d'agglutinines pour *P. novicida* dans un sérum humain tularémique, dans un antisérum tularémique expérimental de lapin, dans un antisérum pesteux de cheval hyperimmunisé, ainsi que dans les antisérums pseudotuberculeux de lapins préparés avec les 5 types de cette espèce microbienne. Un sérum de lapin, obtenu après injections de suspensions formolées de *P. novicida*, agglutine le germe homologue à 1/2 000 et *P. tularensis* à 1/50, mais ne contient pas trace d'agglutinine vis-à-vis de *P. pestis* ni de *P. pseudotuberculosis* (5 types). Notre collègue R. Laporte, que nous remercions de sa grande obligeance, a éprouvé ce sérum sur plusieurs souches de *P. multocida* ; pour lui, l'absence de toute agglutinine atteste que *P. novicida* ne possède aucun antigène somatique identique à celui de *Pasteurella* « *sensu stricto* », dont toutes les souches ont une communauté antigénique décelable quand le test est exécuté avec des suspensions bouillies qui sont privées des antigènes capsulaires.

Quant à la structure antigénique de *P. novicida*, question qui n'a pas été abordée par Larson et coll., nous avons procédé comme nous l'avions fait antérieurement pour *P. tularensis* [2], à la recherche d'un antigène complet (Boivin). Par extraction à l'acide trichloracétique sur un poids de 346,5 mg de germes secs, un antigène complet a été obtenu, fournissant un poids sec total de 10 mg soit une teneur de 2,9 p. 100. Cet antigène, comme celui de *P. tularensis*, s'est montré dépourvu de tout pouvoir pathogène pour la souris à la dose de 1 mg administrée par voie intrapéritonéale. Un lapin en a reçu par voie intraveineuses 6 doses représentant au total 3,25 mg. Son sérum pré-cipitait à 1/100 ; il agglutinait une suspension de *P. novicida* à 1/200 totalement, à 1/500 partiellement, mais était sans action sur *P. tularensis* qui, nous l'avons vu plus haut, agglutinait à 1/50 avec l'anti-sérum des microbes totaux.

Enfin, nous avons noté que de rares souris (une fois 2 sur un lot de 4, une autre fois 3 sur un lot de 20) ayant résisté à une infection expérimentale par *P. novicida* étaient protégées contre une infection tularémique tuant tous les témoins entre trois et sept jours. Mais il faut faire appel à la dose subléthale de *P. novicida* pour observer cette para-immunité, car dans une expérience où l'épreuve était moins sévère et avait entraîné la survie de 13 souris sur les 20 inoculées, aucune de ces survivantes ne résista à la tularémie dans le mois suivant.

En résumé, les circonstances qui ont entouré la découverte de *Pasteurella novicida*, les caractères morphologiques et culturels de ce microorganisme, sa constitution antigénique, la fragilité de sa conser-

vation à la température du laboratoire contrastant avec le maintien de sa vitalité à la glacière et une certaine communauté sérologique et immunologique (qui appelle de nouvelles recherches) avec l'agent de la tularémie, nous font considérer ce germe comme une variété de *Pasteurella tularensis* plutôt que comme une espèce nouvelle de pasteurelle.

## SUMMARY

IS NOT « *PASTEURELLA NOVICIDA* » sp. nov.

A VARIANT OF « *PASTEURELLA TULARENSIS* » ?

It seems that *Pasteurella novicida* must be considered as a variant of *Pasteurella tularensis* rather than as a new species, for the following reasons : the circumstances of its discovery, its morphological and cultural properties, its antigenic constitution, its sensitivity to room temperature and its resistance to low temperature (ice-box) and finally certain serological and immunological properties common with *P. tularensis*.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] LARSON (C. L.), WICHT (W.) et JELLISON (W. L.). *Publ. Hlth Rep.*, 1955, 70, 253.  
[2] GIRARD (G.) et GALLUT (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, 80, 557.

## SUR LA " STRUCTURE EN CORDES " DES MYCOBACTÉRIES

par Paul HAUDUROY et J.-D. PIGUET

(*Institut d'Hygiène, Lausanne*)

M<sup>me</sup> Aitoff, dans deux notes récentes [1], a attiré l'attention sur l'irrégularité de la présence des groupements en torsades dans les cultures de Mycobactéries et de la relation torsades-pouvoir pathogène.

Elle a montré, par ailleurs, que l'adjonction aux milieux de culture de substances à noyau porphyrinique semblait favoriser parfois la formation de torsades pour les souches qui n'en possédaient pas primitivement.

Ayant repris ces essais, nous avons opéré avec quatre souches de Mycobactéries non pathogènes (paratuberculeux) : *M. smegmatis* (souche 169-170 CICC de Lausanne [2]) ; *M. phlei* (souche 689 CICC de Lausanne) ; *M. cou...* [Schuster] (souche 970 CICC de Lausanne).

Chaque souche a été cultivée en milieu de Dubos et dans le même milieu auquel nous avons ajouté 100 µg par centimètre cube de chlorophylle PAD.

Nous résumons dans le tableau ci-joint nos essais.

	169 té	169 chl	689 té	689 chl	170 té	170 chl	970 té	970 chl
départ	+0		0		0		0	
2e repiquage	0	0	0	+0	0	0	0	0
3e repiqu.	0	0	0	++	0	0	0	0
4e repiqu.	0	0	0	++	0	0	0	0
5e repiqu.	+0	+0	0	+	0	0	0	0
6e repiqu. et suivants	0	0	0	0	0	0	0	0

16 = ensemencement en milieu sans chlorophylle; chl = même milieu avec la chlorophylle; 0 = absence totale de torsades; + 0 = présence d'amorces de torsades; + = présence de torsades nettes mais peu abondantes; + + = présence de torsades nettes et abondantes.

Il nous a semblé inutile de poursuivre plus loin ces expériences. Elles démontrent que la présence ou l'absence de torsades dans les cultures de *Mycobactéries* est très irrégulière, l'adjonction de chlorophylle ne paraît pas jouer, dans leur apparition, un rôle très important. Celle-ci est peut-être liée à la composition du milieu, au nombre de repiquages, à d'autres facteurs qui nous échappent, sans qu'il soit possible de découvrir pour le moment les raisons des irrégularités observées.

Ces conclusions confirment les observations de nombreux auteurs, celles de M<sup>me</sup> Aitoff et les réserves déjà formulées par l'un d'entre nous [3].

#### SUMMARY

##### CORD FORMATION BY « MYCOBACTERIA ».

The presence or absence of cords in *Mycobacteria* cultures is very irregular. The addition of chlorophyll does not seem to play an important part in their appearance, which perhaps depends on the composition of the culture medium, the number of passages and certain still unknown factors.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] M<sup>me</sup> AITOFF. *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 504 et **91**, 393.
- [2] CICC. Centre International des Collections de Cultures.
- [3] HAUDUROY (P.) *Derniers aspects du monde des Mycobactéries*, Masson, édit., 1955.

## TROIS NOUVEAUX SÉROTYPES DU GROUPE *SALMONELLA* ISOLES AU CONGO BELGE (*S. KALINA* = 3, 10 : b 1, 2 :

*S. MAMPEZA* = (1), 6, 14, 25, i : 1, 5; *S. GALIEMA* = 6, 7 : k : 1, 2 :

par E. van OYE, G. GHYSELS et H. VAN GOETHEM.

(Institut de Médecine Tropicale « Princesse Astrid »,  
Léopoldville (Congo belge) [Directeur : Dr E. VAN OYE])

La première des souches qui font l'objet de cette note a été isolée par coproculture chez une Européenne de Léopoldville qui souffrait d'une entérite banale.

Il s'agit d'un bacille Gram-négatif, mobile, dont les caractères biochimiques sont les suivants : fermentation, en vingt-quatre heures, avec production de gaz, de l'arabinose, de la dulcité, du glucose, du maltose, de la mannite, du rhamnose, de la sorbite, du tréhalose et du xylose. Ne sont pas attaqués en trente jours : l'adonite, l'inosite, la lactose, le saccharose et la salicine.

Le germe produit de l'hydrogène sulfuré et réduit les nitrates. La réaction de Stern est positive.

Il n'y a pas de production d'indole, ni présence d'uréase. La gélatine n'est pas liquéfiée après soixante jours à 20° C.

Le germe utilise rapidement le citrate de sodium (sur milieu de Simmons, Difco) et le D-tartrate (sur milieu de Jordan et Harmon, Difco).

La réaction de Voges-Proskauer est négative, celle au rouge de méthyl est positive.

Il n'y a pas de développement en milieu au KCN.

En fait, il s'agit des réactions classiques d'un membre du groupe des *Salmonellae*, famille des Entérobactéries.

La culture est agglutinée par un sérum anti-O : 3, 10, 15, 19 non absorbé, ainsi que par notre sérum anti-O : 10 pur, mais non par nos sérums purs anti-O : 15 ou O : 19. Le germe appartient donc au sous-groupe sérologique E.1.

Les antigènes flagellaires sont respectivement « b » et « 1,2 » pour les phases spécifique et non spécifique. L'antigène flagellaire spécifique n'est pas identique à celui de *Salmonella paratyphi* B, mais il ne faut pas perdre de vue qu'il s'agit ici d'un antigène complexe et non pas d'une structure simple. La phase non spécifique est agglutinée par notre sérum polyvalent anti-H : 1, 2, 5..., ainsi que par notre sérum absorbé anti-H : 2, tandis que nos sérums anti-H : 5, H : 6 et H : 7 restent sans action.

La formule antigénique complète est donc : 3, 10 : b : 1, 2.

Le nom de *Salmonella kalina* a été proposé et accepté.

Le second sérotype qui sera décrit dans cette note a été isolé, au

cours d'un examen de routine, des organes d'un cobaye mort dans la Section de Virologie de notre Institut, sans qu'il soit possible de dire si ce germe a joué un rôle pathogène ou non. Chez aucun autre de nos cobayes d'élevage ou d'expérience nous n'avons retrouvé la même *Salmonella*.

Les caractères culturels et les réactions biochimiques de ce germe sont identiques à ceux de *S. kalina* décrit plus haut.

La culture est agglutinée légèrement, et d'une façon incomplète, par notre sérum anti-O : 6, 7, 8, mais ne l'est par aucun de nos sérums absorbés anti-O : 7 et O : 8. Elle possède donc l'antigène O : 6 sans appartenir pour autant à l'un ou l'autre des sous-groupes sérologiques C.1 ou C.2.

Poursuivant nos investigations, nous avons pu observer une agglutination complète et immédiate par nos sérums de groupe H (= antigènes O : 14, 25). Le Dr F. Kauffmann a bien voulu nous signaler que la culture possède aussi partiellement l'antigène intergroupes O : 1.

L'antigène somatique complet de ce sérotype se compose donc des facteurs (1), 6, 14, 25.

La phase flagellaire I est agglutinée uniquement par nos sérums anti-H : i.

La phase flagellaire II est agglutinée par notre sérum polyvalent anti-H : 1, 2, 5 ..., ainsi que par notre sérum absorbé anti-H : 5, à l'exclusion des autres.

La structure antigénique complète peut donc être représentée par la formule : (1), 6, 14, 25 : i : 1, 5.

Le nom de *Salmonella mampeza* a été proposé et accepté

Un troisième nouveau sérotype du groupe *Salmonella* a été isolé récemment à Léopoldville à partir des selles d'un enfant indigène, dont nous ignorons malheureusement l'histoire clinique.

La souche présente les mêmes caractères culturels et biochimiques que les deux nouveaux sérotypes décrits plus haut.

Au point de vue antigénique, le germe présente une structure relativement simple. La culture est agglutinée par notre sérum polyvalent anti-O : 6, 7, 8 et par notre sérum anti-O : 7 pur. Par contre, elle ne l'est pas par un sérum anti-O : 8 pur.

L'antigène flagellaire de la phase spécifique est agglutiné uniquement par nos sérums anti-H : k.

L'antigène flagellaire de la phase non spécifique est agglutiné par un sérum polyvalent anti-H : 1, 2, 5, ..., ainsi que par notre sérum anti-H : 2, les sérums anti-H : 5, H : 6 et H : 7 purs restant sans action.

Cette souche possède donc une structure antigénique qui peut être décrite par la formule : 6, 7 : k : 1, 2.

Le nom de *Salmonella galiema* a été proposé et accepté.

Les trois formules antigéniques décrites ci-dessus ont été vérifiées et confirmées par les Drs F. Kauffmann (International Salmonella Center, Copenhague) et P. R. Edwards (Communicable Disease Center, Atlanta, U. S. A.) que nous tenons à remercier ici pour leur précieuse collaboration.



Résumé. — Les auteurs donnent la description des caractères biochimiques et de la structure antigénique de trois nouveaux sérotypes du groupe *Salmonella*, isolés à Léopoldville (Congo Belge) : *S. kalina* : 3, 10 : b : 1, 2 (isolée par coproculture chez une Européenne), *S. mampeza* : (1), 6, 14, 25 : i : 1, 5 (isolée des organes d'un cobaye) et *S. galiema* : 6, 7 : k : 1, 2 (isolée des selles d'un enfant indigène).

## SUMMARY

THREE NEW TYPES OF THE « SALMONELLA » GROUP  
ISOLATED IN THE BELGIAN CONGO.

Biochemical properties and antigenic structure of three new serotypes of *Salmonella* isolated at Leopoldville are studied. *S. kalina* (3, 10 : b : 1, 2), isolated from the stools of a European ; *S. mampeza* ([1], 6, 14, 25 : i : 1, 5), isolated from organs of a guinea-pig ; *S. galiema* (6, 7 : k : 1, 2), isolated from the stools of a native child.

**MÉTHODES SIMPLES DE RECHERCHE  
DE LA LYSINE-DÉCARBOXYLASE ET DE LA  
TRYPTOPHANE-DESAMINASE A L'AIDE DES MILIEUX  
POUR DIFFÉRENCIATION RAPIDE  
DES ENTÉROBACTÉRIACEES**

par P. THIBAUT et L. LE MINOR

(Institut Pasteur, Paris)

De nombreux milieux donnant les caractères biochimiques essentiels des diverses espèces d'Entérobactéries ont été proposés. En France, nous utilisons couramment le milieu de Hajna sans saccharose (lactose-glucose-SH<sub>2</sub>) préconisé par Roland [1], le milieu de Ferguson additionné de 0,3 p. 100 de tryptophane (urée-indole) proposé par Roland, Bourbon et Szturm [2] et une gélose molle au mannitol (milieu mannitol-mobilité).

Dans cette note technique nous voulons signaler que deux de ces milieux peuvent servir à la mise en évidence de deux caractères enzymatiques très importants pour l'orientation du diagnostic.

RECHERCHE DE LA LYSINE-DÉCARBOXYLASE. — L'intérêt de la recherche des décarboxylase a été montré par Moeller [3], Moeller et Kauffmann [4]. Des méthodes simplifiées ont été proposées par Moeller [5] et Carlquist [6]. Mais elles nécessitent des milieux spéciaux. Nous avons employé la réaction à la ninhydrine comparativement sur le milieu liquide préconisé par Carlquist et sur le milieu gélosé lactose-glucose-SH<sub>2</sub>.

**PRINCIPE.** — Gale [7] a montré que les décarboxylases des bacilles Gram-négatifs n'agissent que sur les amino-acides ayant au moins un groupement chimique actif autre que le carboxyle terminal et les groupes  $\alpha$ -aminés : la lysine est décarboxylée en cadavérine, l'histidine en histamine, etc. Par chromatographie, Carlquist [6] a montré que la réaction à la ninhydrine pratiquée sur un extrait chloroformique d'un milieu complexe alcalinisé se produit essentiellement avec la cadavérine.

**TECHNIQUE.** — Les cultures sur milieux à l'hydrolysate de caséine d'une part, au lactose-glucose-SH<sub>2</sub> d'autre part, sont additionnées, après séjour de dix-huit heures à 37°, de 1 cm<sup>3</sup> de NaOH 4 N (le titre de la soude n'a pas besoin d'être déterminé exactement ; on obtient les mêmes résultats avec la lessive de soude diluée de moitié) et de 2 cm<sup>3</sup> de chloroforme. Après agitation modérée, on laisse le chloroforme décanter, ou, éventuellement, on centrifuge. On prélève environ 0,5 cm<sup>3</sup> de chloroforme parfaitement limpide (il est important de ne pas emmener de phase aqueuse) qui est transvasé dans un petit tube. On ajoute un volume égal d'une solution à 0,1 p. 100 de ninhydrine dans le chloroforme. Une réaction positive se traduit par une belle coloration violet-améthyste apparaissant au bout de trois à cinq minutes à la température du laboratoire. La réaction est considérée comme négative si, au bout de dix minutes, aucune coloration n'est apparue. Carlquist conseille de ne pas attendre plus de quatre minutes et de ne pas chauffer le tube, car des réactions faussement positives, dues à la présence dans le chloroforme de composés mineurs réagissant avec la ninhydrine, pourraient apparaître. Nous n'avons pas observé, avec la ninhydrine et le chloroforme dont nous disposons, de réactions faussement positives. Seules, certaines souches donnent une coloration très pâle au bout de quinze minutes, qui ne peut prêter à confusion avec la coloration violette.

**RÉSULTATS.** — Ils furent tous identiques sur milieu lactose-glucose-SH<sub>2</sub> et sur milieu de Carlquist.

*Salmonella* : 80 souches de divers groupes sérologiques y compris des souches R et *S. gallinarum-pullorum* : toutes fortement positives sauf 2 souches sur 7 de *S. paratyphi* A qui n'étaient que faiblement positives et 3 autres négatives.

*Arizona* : 65 souches. Toutes fortement positives.

*Bethesda* : 63 souches. Toutes négatives.

*Providencia* : 20 souches. Toutes négatives.

*Proteus mirabilis* (8 souches), *vulgaris* (6), *morganii* (20), *rettgeri* (12), toutes négatives.

*E. coli* : souches-types de O : 1 à O : 110. Toutes positives, sauf O : 18, O : 19, O : 30, O : 36, O : 67, O : 68, O : 72, O : 86 et O : 94.

*Shigella* des divers groupes : 15. Toutes négatives.

*Cloaca* : 6 souches. Cinq faiblement positives, 1 négative.

*Klebsiella* : 10 souches. Positives, sauf *Kl. rhinoscleromatis* (3) et *ozaenae* (1).

En conclusion, cette réaction est d'une grande valeur pour le diagnostic différentiel des *Arizona-Salmonella* d'une part et des *Bethesda*

d'autre part. Plus fidèle que le test de Braun au CNK, cette réaction ne nécessite pas de milieu spécial se conservant mal. Comme Moeller l'a signalé, elle peut aussi être utile pour séparer *Kl. rhinoscleromatis* et *ozenae* (—) des autres *Klebsiella* (+).

RECHERCHE DE LA TRYPTOPHANE-DÉSAMINASE. — Certaines espèces d'Entérobactéries possèdent un enzyme qui provoque une désamination oxydative d'acides aminés et les transforment en leur acide cétonique correspondant. Bernheim et coll. [8], Henricksen et Closs [9] ont proposé de rechercher la transformation de la L-phényl-alanine en acide phényl-pyruvique, réaction pour l'étude de laquelle l'un de nous a proposé, avec Ben Hamida, une méthode simplifiée [10]. Singer et Volcani [11] ont étudié la désamination oxydative de 8 acides aminés et en concluent que le tryptophane est le meilleur substrat pour objectiver cette réaction.

Nous avons voulu savoir si le milieu de Ferguson additionné de tryptophane pouvait servir comme méthode simple à la recherche de l'uréase, de l'indole et de la tryptophane-désaminase (TDA) à la fois. Les résultats ont été parfaitement satisfaisants.

MÉTHODE. — Une suspension épaisse de la souche à l'étude dans un petit volume de milieu (IV gouttes) est laissée au moins deux heures à l'étuve à 37°, ou bien agitée pendant quinze minutes dans un appareil du type utilisé pour la réaction de Kahn. Pour mettre en évidence l'acide indolacétique, il suffit d'ajouter 1 goutte de la solution officinale de chlorure ferrique (26 p. 100) diluée au tiers dans de l'eau distillée. Des essais comparatifs nous ont montré qu'il était inutile d'acidifier par un tampon ou de l'acide chlorhydrique. Une réaction positive se traduit par une coloration brun rougeâtre, une réaction négative par une couleur jaune.

Il est évidemment possible d'effectuer cette réaction sur une fraction d'un milieu ayant servi à la recherche de l'uréase, dont l'autre fraction servira à la recherche de l'indole au moyen du réactif de Kovacs. C'est cette méthode que nous employons maintenant de manière systématique.

RÉSULTATS. — 80 souches de *Salmonella*, 65 d'*Arizona*, 63 *Bethesda*, 106 *E. coli*, 15 *Shigella*, 6 *Cloaca* et 10 *Klebsiella* ont donné une réaction négative.

Tous les *Providencia* (20 souches), les *Proteus mirabilis* (8), *vulgaris* (6), *morganii* (20), *rettgeri* (12) ont donné une réaction positive.

CONCLUSION. — Cette réaction permet de différencier rapidement les *Proteus* (uréase +, TDA +), les *Providencia* (uréase —, TDA +), les *Klebsiella* (uréase + en général, TDA —).

RÉSUMÉ. — Il est possible de pratiquer sur les milieux usuels pour diagnostic différentiel rapide des Entérobactéries, deux réactions simples d'un grand intérêt.

La lysine-décarboxylase peut être recherchée sur milieu lactose-

glucose-SH<sub>2</sub>. Elle est présente chez les *Salmonella* (sauf certaines *S. paratyphi* A) et *Arizona*, absente chez les *Bethesda*.

La tryptophane-désaminase peut être recherchée sur milieu de Ferguson additionné de tryptophane en y ajoutant 1 goutte d'une solution de chlorure ferrique. La réaction est positive avec les *Proteus* et *Providencia*, négative avec les autres Entérobactéries.

### SUMMARY

#### SIMPLE METHODS OF DEMONSTRATION OF LYSINE DECARBOXYLASE AND TRYPTOPHANE DESAMINASE ON MEDIA FOR RAPID DIFFERENTIATION OF « ENTEROBACTERIACEAE ».

Two simple and very important reactions can be carried out on usual media for the differential diagnosis of *Enterobacteriaceae*. Lysine decarboxylase can be demonstrated on lactose-glucose-SH<sub>2</sub> media; this reaction is positive with *Salmonella* (except with certain *S. paratyphi* A) and *Arizona*, negative with *Bethesda*.

Tryptophane desaminase can be demonstrated on Ferguson medium + tryptophane with the addition of one drop of iron chloride solution; the reaction is positive with *Proteus* and *Providencia*, negative with the other *Enterobacteriaceae*.

★ ★

Depuis la rédaction de cette note, nous avons reçu un article de P. R. Edwards, M. F. Fife et W. H. Ewing (Am. J. Technol., 1956, 22, 28) qui montrent, eux aussi, en utilisant le milieu de Carlquist, l'intérêt diagnostique de la recherche de la lysine-décarboxylase.

### BIBLIOGRAPHIE

- [1] ROLAND (F.). *Bull. méd.*, 1946, 60, 397.
- [2] ROLAND (F.), BOURBON (D.) et SZTURM (S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, 73, 914.
- [3] MOELLER (V.). *Acta path. microb. scand.*, 1954, 35, 259.
- [4] MOELLER (V.) et KAUFFMANN (P.). *Acta path. microb. scand.*, 1955, 36, 173.
- [5] MOELLER (V.). *Acta path. microb. scand.*, 1955, 36, 158.
- [6] CARLQUIST (P. R.). *J. Bact.*, 1956, 71, 339.
- [7] GALE (E. F.). *The Chemical activities of Bacteria*, 3<sup>e</sup> éd., University Tutorial Press, Londres, 1951.
- [8] BERNHEIM (F.), BERNHEIM (M. L. C.) et WEBSTER (D.). *J. biol. Chem.*, 1935, 440, 165.
- [9] HENRIKSEN (S. D.) et CLOSS (K.). *Acta path. microb. scand.*, 1938, 45, 101.
- [10] BEN HAMIDA (F.) et LE MINOR (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, 90, 671.
- [11] SINGER (J.) et VOLCANI (R. E.). *J. Bact.*, 1955, 69, 303.

UN NOUVEAU SÉROTYPE DE *SALMONELLA**S. DALAT* (4, 12, 27 :  $\gamma$  :  $e n x$ )

par L. LE MINOR, R. MILLE et M. CAPPONI

(avec la collaboration technique de D. DREAN et VO THANH)

(Instituts Pasteur de Paris et de Dalat)

Cette souche (607) a été isolée le 1<sup>er</sup> octobre 1956 à Dalat (Vietnam) des matières fécales d'un gecko capturé à Phanrong. Les geckos sont des lézards de forte taille, vivant dans le sable au voisinage des habitations et communément vendus au marché. Ils sont consommés par les Vietnamiens de la côte, après une cuisson sommaire, avec le riz.

Ce bacille Gram-négatif, mobile, anaérobie facultatif, ne possède pas d'uréase, ne cultive pas sur milieu de Braun au CNK. Il ne transforme pas la phényl-alanine en acide phényl-pyruvique, ni le tryptophane en acide indol-acétique, possède une lysine décarboxylase. Il fait fermenter en vingt-quatre heures les milieux contenant les oses ou alcools suivants : xylose, arabinose, rhamnose, glucose (+ gaz), mannitol, sorbitol, dulcitol, maltose, tréhalose ; le milieu au sorbose est acidifié en trois jours. Il est sans action sur : adonitol, lactose, saccharose, inositol et salicine. Il cultive sur milieu au citrate de sodium de Simmons, produit de l' $H_2S$ . Il ne protéolyse pas la gélatine et ne produit pas d'indole. Le D-tartrate de Na (Käuffmann) est fermenté en deux jours, la réaction au rouge de méthyle est positive, celle de Voges-Proskauer négative.

Sur lame, cette souche est agglutinée par les sérums anti-O : 4, O : 27 et anti- $\gamma$ . La phase 2 est apparue après culture sur gélose + sérum anti- $\gamma$  : une agglutination se produit alors dans les sérums anti- $e n x$ ,  $e n z_{15}$  et  $x$  saturé.

En tubes, la suspension O est agglutinée à  $1/100 \pm$  par le sérum anti-I, 3, 19 préparé avec *S. senftenberg* (et dont le titre anti-O : 1 est  $1/400$ ), à  $1/3\ 200$  dans le sérum anti-O : 4, 12 (*S. essen* : titre homologue  $1/3\ 200$ ), à  $1/3\ 200$  dans le sérum anti-O : 4, 12, 27 (*S. shleissheim* : titre homologue  $1/6\ 400$ ) et  $1/1\ 600$  dans le sérum anti-O : 9, 12 (*S. typhi* : titre homologue  $1/12\ 800$  agglutinant *S. paratyphi* A et B à  $1/1\ 600$ ).

Cette souche sature totalement les agglutinines du sérum anti-O : 4, 12, 27.

La phase 1 ( $\gamma$ ) est agglutinée au titre homologue ( $1/25\ 600$ ) par le sérum anti-*S. mikawasima* phase 1. Elle en sature totalement les agglutinines anti- $\gamma$ .

La phase 2 ( $e n x$ ) est agglutinée au titre homologue ( $1/25\ 600$ ) par un sérum anti-*S. abortus equi*. Elle en sature totalement les agglutinines H.

La formule de cette *Salmonella* est donc 4, 12, 27 :  $\gamma$  :  $e n x$ .



Nous remercions le Dr Kauffmann d'avoir bien voulu confirmer cette formule.

Résumé. — Description d'un nouveau sérotype de *Salmonelle* (4, 12, 27 : y : e n x) isolé d'un lézard à Dalat (Vietnam).

#### SUMMARY

A NEW SEROTYPE OF « *SALMONELLA* » : « *S. DALAT* ».

Description of a new *Salmonella* serotype, *S. Dalat*, isolated from a lizard at Dalat (Vietnam).

### PEROXYDATION DE LA THYMINE PAR LES RAYONS X

par B. EKERT et R. MONIER

(Institut Pasteur [Service de Radiobiologie] et Fondation Curie)

Des travaux récents (voir [1]) suggèrent que les peroxydes radioformés pourraient, notamment chez les microorganismes, jouer un rôle déterminant, comme intermédiaires chimiques, dans l'action des radiations ionisantes sur la matière vivante. Scholes et coll. [2] ont mis en évidence la formation de peroxydes organiques lors de l'irradiation, par les rayons X, de solutions aqueuses aérées d'acide nucléique, de nucléotides renfermant les bases pyrimidiques thymine et uracile et, enfin, de ces bases elles-mêmes. Cette observation présente un intérêt d'autant plus grand que maintes actions biologiques importantes des radiations sont liées aux altérations des nucléoprotéines.

Dans les expériences de Scholes et coll., la quantité de peroxydes organiques formés est calculée en faisant la différence entre l'oxygène peroxydique total (eau oxygénée + peroxydes organiques), dosé par la libération d'iode à partir de l'iodure de potassium [3], et l'oxygène peroxydique de l'eau oxygénée, dosée spécifiquement par son complexe titanique [4]. Cette méthode peut prêter à la critique, car la réaction entre l'iodure de potassium et un peroxyde organique en présence d'eau oxygénée n'est pas toujours stoechiométrique [5], et nous avons cherché à la contrôler en l'appliquant à des solutions de thymine irradiées, les unes en absence, les autres en présence de catalase cristallisée (Worthington Lab., 150 unités par centimètre cube). Ainsi que le montrent les résultats du tableau I, la catalase détruit spécifiquement l'eau oxygénée au fur et à mesure de sa formation, sans que la valeur obtenue pour le peroxyde de thymine en soit affectée sensiblement. Il semble donc que la méthode employée par Scholes et coll. soit valable dans ce cas particulier.

TABLEAU I. — Irradiation de la thymine en présence de catalase.

	Eau oxygénée ( $\mu$ moles/cm <sup>3</sup> )	Peroxyde organique ( $\mu$ équivalents/cm <sup>3</sup> )
sans catalase	0,28	0,22
en présence de catalase	0,00	0,25

Thymine en solution aqueuse  $10^{-3}$  M. Caractéristiques du rayonnement : cathode de molybdène fonctionnant sous 40 kv, 36 mA. Débit : 10 000 r/m. Filtration par 0,05 mm Al. Dose totale : 300 000 r.

TABLEAU II. — Destruction de la thymine et production du peroxyde en fonction de la dose.

(Conditions expérimentales identiques à celles du tableau II.)

Dose (kr)	Peroxyde <sup>(1)</sup> organique	Thymine non détruite <sup>(1)</sup>	
		I <sup>(2)</sup>	II <sup>(3)</sup>
150	11,5	83,8	-
250	20,6	64,3	61,0
400	25,5	27,0	25,6
800	33,0	7,0	-

(1) En % de la thymine initiale. (2) D'après la densité optique à 265  $m\mu$  des solutions irradiées. (3) Après chromatographie.

Nous avons en outre étudié la destruction de la thymine et la formation du peroxyde en fonction de la dose. La thymine restée intacte a été directement déterminée aussitôt après l'irradiation d'après la densité optique à 265  $m\mu$  des solutions irradiées. Dans certaines expériences, nous avons également dosé la thymine après chromatographie sur colonne de résine Dowex 1 [6]. Les solutions irradiées étaient, dans ce cas, abandonnées à la température ordinaire pendant soixante-douze heures environ, pour permettre la destruction spontanée de l'eau oxygénée et du peroxyde, avant d'être chromatographiées. Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau II. On voit que :

1° Après une dose suffisante, la densité optique des solutions irradiées devient très faible malgré la présence d'une quantité élevée de peroxyde ;

2° La différence entre le résultat du dosage après chromatographie n'excède pas 5 p. 100.

Ces considérations, jointes à l'observation que la densité optique des solutions irradiées ne varie pas au cours de la destruction spontanée du peroxyde, permettent de conclure que cette densité optique

est due pour 95 p. 100 au moins à la thymine intacte. Le peroxyde et ses produits de décomposition n'ont donc qu'une absorption négligeable dans cette région du spectre. Cette conclusion est en accord avec l'hypothèse de Weiss [7], selon laquelle la peroxydation de la thymine résulterait d'une attaque au niveau de la double liaison en 4, 5.

Nous cherchons actuellement dans notre laboratoire à préciser la structure du peroxyde de thymine par voie de synthèse et à en apprécier l'importance biologique réelle.

### SUMMARY

#### THE PEROXIDATION OF THYMINE BY X RAYS.

The exact amount of thymine hydroperoxyde formed during irradiation of aerated aqueous solutions of thymine by X rays has been controlled by irradiating in the presence of catalase, which specifically destroys radioformed hydrogen peroxide. Some properties of thymine hydroperoxide are described.

### BIBLIOGRAPHIE

- [1] LATARJET (R.). *Ionizing radiations and cell metabolism*, in *A Ciba Foundation Symposium*, Churchill, édit., London, 1956, 275.
- [2] SCHOLES (G.), WEISS (J.) et WHEELER (C. M.). *Nature*, 1956, **178**, 157.
- [3] HOCHENADEL (C. J.). *J. phys. Chem.*, 1952, **56**, 587.
- [4] EISENBERG (G. M.). *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 1943, **15**, 327.
- [5] ECERTON (A. C.), EVERETT (A. J.) et MINKOFF (G. J.). *Nature*, 1954, **173**, 399.
- [6] COHN (W.). *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 1471.
- [7] WEISS (J.). (Communication personnelle.)

## **ACTION *IN VITRO* DE L'ASSOCIATION SPIRAMYCINE- CHLORAMPHÉNICOL SUR LA MULTIPLICATION DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

par N. MATHIEU et M. FAGUET

(Institut Pasteur, Service du Bactériophage)

La spiramycine, dont nous étudions dans ce travail l'action *in vitro* sur *Staphylococcus aureus* en association avec les principaux antibiotiques connus, fut présentée pour la première fois au Colloque de Washington sur les antibiotiques par Pinnert-Sindico, Ninet, Preud'homme et Cosar [1]. Elle est isolée à partir de culture de *Streptomyces ambofaciens* dans un échantillon de terre du nord de la France.

Cet antibiotique présente une activité importante vis-à-vis des infections à germes Gram-positifs et il est sans action notable sur la flore Gram-négative. Cette propriété présente une grande importance, puisqu'elle permet à cet antibiotique de ne pas détruire la flore intestinale qui s'oppose dans l'intestin à la pullulation de germes tels que le staphylocoque. Or, on sait que ce dernier est souvent en cause au cours des complications intestinales consécutives quelquefois à l'utilisation des antibiotiques du groupe des tétracyclines.

On sait, d'autre part, que de nombreux microbes pathogènes ont progressivement acquis une résistance plus ou moins grande à la plupart des antibiotiques, le staphylocoque en particulier. Pour essayer de remédier à cet état de choses, de nombreux auteurs ont préconisé l'utilisation simultanée de plusieurs antibiotiques. Dans certains cas, il y a addition des actions ; dans d'autres, il y a synergie et enfin, parfois, il y a diminution d'activité.

Nous avons choisi *Staphylococcus aureus* et nous avons étudié l'influence sur sa multiplication *in vitro* de la spiramycine en association avec les principaux antibiotiques connus : pénicilline, streptomycine, érythromycine, chloramphénicol, tétracycline.

TECHNIQUES GÉNÉRALES. — Nous avons utilisé, pour ces études, la technique des enregistrements continus [2] des courbes de croissance microbienne.

La spiramycine était en solution aqueuse, faiblement concentrée. Le germe utilisé était *Staphylococcus aureus* (souche Londres).

Le milieu de culture avait la composition suivante : eau peptonée, 3 p. 100 ; glucosée à 0,5 p. 100 environ. Il était ajusté à pH 7,5-7,6.

L'ensemencement était fait à partir d'une culture de vingt-quatre heures à 37° C, sur gélose inclinée, mise en suspension en eau peptonée au moment de l'emploi. Cette suspension contenait environ  $1,3 \cdot 10^9$  germes par centimètre cube.

Le milieu ainsi préparé et ensemencé ( $10^8$  germes par centimètre cube), était réparti dans les 6 cuves cylindriques du microbiophotomètre enregistreur, dont la température était réglée à 35° C. A chacune des cuves on ajoutait la quantité d'antibiotique nécessaire à l'expérience.

Ces cultures étaient agitées et aérées par le système de va-et-vient du liquide, actionné automatiquement et périodiquement par une pompe (vingt-cinq fois par minute).

EXPÉRIMENTATION. — 1° Action de la spiramycine sur *Staphylococcus aureus* (souche Londres). En utilisant les techniques précédemment décrites, nous avons enregistré la croissance de la culture de ce germe en présence de quantités croissantes de spiramycine (de  $0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  à  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ). Nos résultats sont résumés par les courbes de la figure 1.

2° Action du chloramphénicol sur la croissance de *Staphylococcus aureus* (souche Londres). Nous avons étudié cette action entre les concentrations de  $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  et  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ .

La lecture des courbes (fig. 2) montre que la phase de latence est augmentée de deux heures pour une concentration de  $1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ , de

trois heures pour  $2 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  et de quatre heures pour  $3 \mu\text{g}$ . Elle montre, de plus, une nette diminution de la vitesse de croissance.

3° Action de l'association spiramycine-chloramphénicol sur la croissance de *Staphylococcus aureus* [souche Londres] (fig. 3).

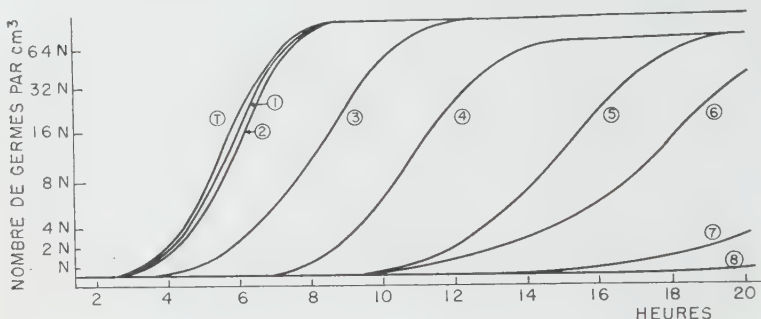


FIG. 1. — La courbe T représente la courbe de croissance de *Staphylococcus aureus* (Londres) en eau peptonée, glucosée; courbe 1,  $0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  de spiramycine; courbe 2,  $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ; courbe 3,  $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ; courbe 4,  $1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ; courbe 5,  $2 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ; courbe 6,  $3 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ; courbe 7,  $3 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ; courbe 8,  $4 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ .

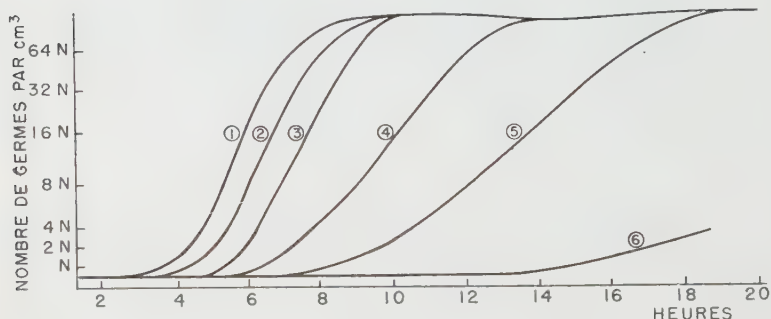


FIG. 2. — Courbes de croissance de *Staphylococcus aureus* (souche Londres) enregistrées au microbiophotomètre en eau peptonée, glucosée en présence des quantités suivantes de chloramphénicol: courbe 1, culture témoin; courbe 2,  $0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ; courbe 3,  $1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ; courbe 4,  $2 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ; courbe 5,  $3 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ; courbe 6,  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ .

Nous avons étudié les doses suivantes :

1 : Témoin.

2 :  $0,1 \mu\text{g}$  spiramycine +  $2 \mu\text{g}$  chloramphénicol.

3 :  $0,1 \mu\text{g}$  spiramycine +  $3 \mu\text{g}$  chloramphénicol.

4 :  $0,5 \mu\text{g}$  spiramycine +  $1 \mu\text{g}$  chloramphénicol.

5 :  $0,5 \mu\text{g}$  spiramycine +  $2 \mu\text{g}$  chloramphénicol.

6 :  $0 \mu\text{g}$  spiramycine +  $2 \mu\text{g}$  chloramphénicol.



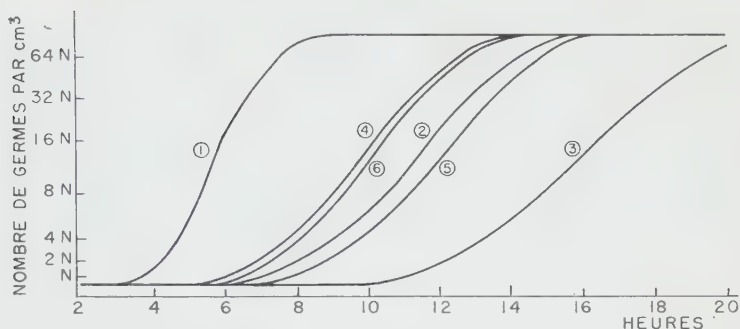


FIG. 3. — Courbes de croissance de *Staphylococcus aureus* (souche Londres) en eau peptonée, glucosée, en présence de l'association spiramycine (S) + chloramphénicol (C), aux doses suivantes par centimètre cube de milieu : courbe 1, témoin ; courbe 2, 0,1  $\mu\text{g}$  S + 2  $\mu\text{g}$  C ; courbe 3, 0,1  $\mu\text{g}$  S + 3  $\mu\text{g}$  C ; courbe 4, 0,5  $\mu\text{g}$  S + 1  $\mu\text{g}$  C ; courbe 5, 0,5  $\mu\text{g}$  S + 2  $\mu\text{g}$  C ; courbe 6, 0  $\mu\text{g}$  S + 2  $\mu\text{g}$  C.

DISCUSSION. — L'examen des courbes de la figure 3 permet de faire les constatations suivantes :

a) Les courbes 2 et 5 ne sont pas confondues : elles correspondent toutes les deux à une concentration de 2  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  de chloramphénicol, la cuve 2 contenant en outre 0,1  $\mu\text{g}$  de spiramycine/ $\text{cm}^3$ .

Or, la spiramycine seule, à cette dose, donne une courbe de croissance qui se confond avec celle du témoin : il y a donc, du fait de l'association étudiée, augmentation des effets.

b) Si nous superposons les courbes de croissance des cultures contenant respectivement 0,5  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  de spiramycine seule et 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  de chloramphénicol seul, nous voyons qu'elles sont presque superposables

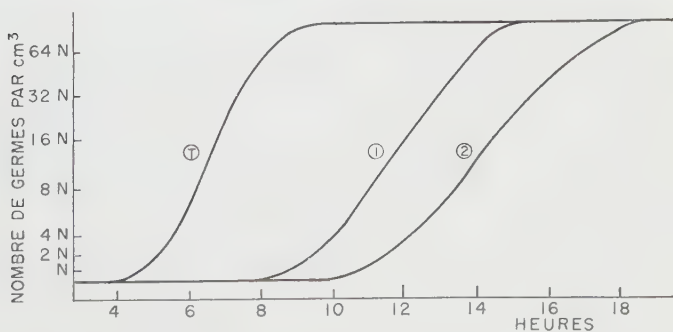


FIG. 4. — Courbes de croissance de *Staphylococcus aureus* (souche Londres) en eau peptonée, glucosée en présence de chloramphénicol et de spiramycine : courbe T, Témoin ; courbe 1, 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  de spiramycine ; courbe 2, 1  $\mu\text{g}$  de spiramycine + 1  $\mu\text{g}$  de chloramphénicol.

et présentent un même écartement de la courbe témoin. Or, les courbes 4 et 6 sont pratiquement confondues : elles correspondent aux concentrations suivantes :

Courbe 6 : 2  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  de chloramphénicol.

Courbe 4 : 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  de chloramphénicol + 0,5  $\mu\text{g}$  de spiramycine.

c) Ces résultats sont confirmés par les courbes de la figure 4, où la spiramycine seule (courbe 1), à la dose de 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ , allonge de quatre heures la phase de latence, alors que l'adjonction de chloramphénicol (courbe 2), à la dose de 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ , allonge ce même temps de six heures (1  $\mu\text{g}$  de chloramphénicol seul provoque un retard de deux heures).

CONCLUSIONS. — La spiramycine et le chloramphénicol, en association, présentent une activité dont la valeur est additive des effets isolés de chacun des antibiotiques, vis-à-vis de la croissance de *Staphylococcus aureus* (souche Londres).

## SUMMARY

### *In vitro* ACTIVITY OF SPIRAMYCIN-CHLORAMPHENICOL ASSOCIATION ON THE DEVELOPMENT OF « S. AUREUS ».

The authors demonstrate the synergic activity of spiramycin and chloramphenicol when the two antibiotics are used in association.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] PINNERT-SINDICO, NINET, PREUD'HOMME et COSAR. *Colloque de Washington sur les antibiotiques*, 25-28 octobre 1954.
- [2] FAGUET (M.). *La photoélectricité dans l'enregistrement de la croissance bactérienne*, Hermann, édit., 1941, n° 898.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

**Etude du développement du virus de la myxomatose en cultures de tissus**, par R. MARAL.

**L'antigénothérapie spécifique dans le traitement des staphylococcies rebelles et récidivantes**, par G. MOUSTARDIER, R. PAUTRIZEL, L. TASEI et J. P. DE PERETTI.

**Détermination de l'action bactéricide *in vivo* des antibiotiques dans la staphylococcie rénale de la souris**, par Y. CHABBERT, F. BOYER, M. SAVIART, H. BOULINGRE et J. HERVÉ.

**Le comportement en culture du tissu cérébral infecté par le virus rabique. L'évolution des corpuscules de Negri *in vitro* dans le tissu cérébral rabique**, par IHSAN SUKRU AKSEL et TALIA BALI AYKAN.

## AVIS

Le prochain Congrès de l'Association Générale des Hygiénistes et Techniciens Municipaux se tiendra, du 27 mai au 6 juin 1957, à Madrid.

Les questions inscrites à l'ordre du jour sont les suivantes :

- a) Utilisation du sous-sol de la voirie urbaine ;
- b) Evolution actuelle de la technique de réalisation des lits bactériens ;
- c) Utilisation rationnelle des ressources en eau d'une région donnée ;
- d) Les réalisations techniques de la Municipalité de Madrid.

Pour tous renseignements, s'adresser au Secrétariat de l'A. G. H. T. M., 9, rue de Phalsbourg, Paris, 17<sup>e</sup>.

## LIVRES REÇUS

J. Desbordes et G. Strauss. — *La législation du laboratoire d'analyses médicales*. 2<sup>e</sup> édition. 1 vol., 277 p., Editions du Creuset, Paris, 1956.

Les auteurs ont réuni dans ce petit volume tous les textes de loi qui réglementent la fondation et l'activité des laboratoires, les questions relatives à la Sécurité sociale, la médecine du travail, aux cours et stages pour l'obtention des divers diplômes, etc. Ce livre, dont les auteurs nous présentent aujourd'hui la seconde édition, beaucoup plus complète que celle de 1947, rendra de grands services à tous ceux qui auront à diriger ou à gérer un laboratoire d'analyses médicales.

H. T.

*Ciba Foundation Symposium on ionizing radiations and cell metabolism*. 1 vol., 318 p., J. et A. Churchill, édit., Londres, 1956. Prix : 45 shillings.

Le mécanisme de l'altération des tissus par les radiations, malgré les nombreuses recherches qui lui ont été consacrées, demeure encore mystérieux. Les travaux décrits dans le présent volume permettront de serrer la question de plus près. Ils concernent l'effet des radiations sur les enzymes et les coenzymes, sur les acides nucléiques et les nucléoprotéines, sur la synthèse des protéines, sur le métabolisme de l'acide désoxyribonucléique, l'induction des aberrations chromosomiques par les radiations et les agents mutagènes, leur action sur la spécificité de l'ADN des virus et des bactéries, et quelques autres recherches sur l'influence des agents extérieurs sur le métabolisme cellulaire et sur les effets des radiations.

H. T.

*Arbeiten aus dem Paul-Ehrlich-Institut, dem Georg-Speyer-Haus und Ferdinand-Blum-Institut zu Frankfurt a. M. N° 52: Richard Prigge zum 60. Geburtstag.* 1 vol., 201 p., 38 fig., Gustav Fischer Verlag, édit., Stuttgart, 1956, Prix : 27 DM.

Outre un résumé de la carrière du professeur Prigge et une liste de ses publications, le volume contient treize articles rédigés par différents auteurs appartenant presque tous à l'Institut Paul-Ehrlich de Francfort, et qui traitent de divers sujets de bactériologie, sérologie, chimiothérapie, groupes sanguins, techniques (électrophorèse, etc.). Chaque article est illustré de figures et de graphiques et comporte sa bibliographie.

H. T.

*Arbeiten aus dem Paul-Ehrlich-Institut, dem Georg-Speyer-Haus und dem Ferdinand-Blum-Institut zu Frankfurt a. M. N° 53. F. BLUM. — Die Rolle der Kohlensäure im Innenleben des Organismus.* 1 vol., 102 p., Gustav Fischer Verlag, édit., Stuttgart, 1956. Prix : 13,50 DM.

Cet ouvrage résume les recherches que l'auteur a faites au cours de sa longue carrière. Il étudie expérimentalement les effets produits par l'inhalation de mélanges d'air et de  $\text{CO}_2$  chez l'animal normal et chez l'animal privé d'hypophyse ou de surrénale, les modifications du métabolisme du calcium et du cholestérol, l'influence de la thyroïde, les interactions entre  $\text{CO}_2$  et insuline, adrénaline, glucagon, ACTH, cortisone. Une seconde partie étudie les modes d'action de divers anti-diabétiques (adrénaline, insuline, etc.) et compare les résultats de l'administration orale et parentérale de ces produits.

H. T.

**R. Leroux, P. Gauthier-Villars et F. Busser.** — *Pratique anatomopathologique. Microscopie.* 2<sup>e</sup> édition, refondue, par J. Delarue, P. Gauthier-Villars, F. Busser et Ch. Gouygou. 1 vol., 337 p., 167 fig., Masson, édit., Paris, 1957. Prix : 1 800 fr.

Ce petit manuel est destiné aux étudiants en médecine, mais il est assez complet pour s'adresser également aux spécialistes de l'anatomopathologie. On y trouvera l'étude détaillée de toutes les lésions des divers organes et d'abondantes illustrations permettant de les suivre et de les reconnaître.

H. T.

*Mises au point de chimie analytique pure et appliquée et d'analyse bromatologique*, publiées sous la direction de J.-A. Gautier. 4<sup>e</sup> série. 1 vol., 208 p., Masson, édit., Paris, 1956. Prix : 2 400 fr.

Cet ouvrage réunit les articles suivants : Quelques acquisitions récentes dans le domaine de l'analyse des glucides, par J.-E. Courtois. La détermination de l'extrait sec des vins, par P. Jaulmes et M<sup>lle</sup> G. Hamelle. L'acétylation de la fonction hydroxyle, ses applications analytiques, par P. Mesnard. Conservation et analyse des échantillons altérables ; étude spéciale du cas des laits, par P. Navellier. La polarographie et ses applications analytiques, par P. Souchay. Les substances étrangères dans les aliments, par R. Truhaut.

H. T.



**Jean Verne.** — *Précis d'histologie*, 4<sup>e</sup> édition. 1 vol., 690 p., 408 fig. Masson, édit., Paris, 1956. Prix : broché, 2 600 fr., cartonné, 3 200 fr.

Il s'agit de la quatrième édition de ce Précis, dont la première avait paru en 1934, et qui a été remaniée dans sa présentation et complétée. Deux nouveaux chapitres, en particulier, ont été ajoutés, concernant la cytochimie (enzymes, radio-isotopes) et la microscopie électronique. Il contient tout ce qui est nécessaire à l'étudiant préparant l'examen d'histologie et est en même temps suffisamment complet pour permettre à un médecin ou à un biologiste de se tenir au courant de l'état actuel des différents problèmes de la structure de la cellule, des tissus et des organes.

H. T.

**R. Hare.** — *An outline of bacteriology and immunity*, 1 vol., 418 p., Longmans, édit., Londres, 1956. Prix : 35 shillings.

Ce manuel reproduit les conférences faites par l'auteur aux étudiants d'une école de médecine de Londres et passe en revue tout ce que doivent savoir les étudiants en médecine sur la question. C'est pourquoi il revêt plutôt l'aspect d'un traité pratique, l'accent étant mis sur le rôle des microorganismes chez l'homme, le mode d'action des agents chimiothérapeutiques et les questions d'épidémiologie. Les chapitres consacrés aux virus et aux champignons tiennent une place aussi importante que ceux étudiant les bactéries. De même l'immunologie et l'allergie sont traitées du point de vue médical et les anticorps étudiés surtout en ce qui concerne leur rôle dans les infections. De nombreuses figures et tableaux illustrent le volume.

H. T.

# JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY

Editors : B. C. J. G. KNIGHT and A. F. B. STANDFAST

*Contents of Volume 16, No. 3, June 1957.*

NIEL (C. B. van). Obituary notice : Albert Jan Kluyver (1888-1956).

IVANOVICS (G.) and ALFÖLDI (L.). Bacteriocinogenesis in *Bacillus megaterium*.

TURNER (E. M.). The effect of some amino acids on the growth of two varieties of *Ophiobolus graminis*.

MOSES (V.). The metabolic significance of the citric acid cycle in the growth of the fungus *Zygorrhynchus moelleri*.

BARTLETT (G. W.) and MOSES (V.). The pathway of glucose metabolism in *Zygorrhynchus moelleri*.

MUCIBABIC (S.). The growth of mixed populations of *Chilomonas paramecium* and *Tetrahymena pyriformis*.

BISSET (K. A.), BAIRD-PARKER (A. C.), HALE (C. M. F.), JEYNES (M. H.) and LAWRENCE (J. C.). The production of Gram-positive variants by *Azotobacter chroococcum*.

GROSSOWICZ (N.), HAYAT (P.) and HALPERN (Y. S.). Pyocyanine biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*.

MAXTED (W. R.). The active agent in nascent phage lysis of streptococci.



- LITTLEWOOD (D.) and POSTGATE (J. R.). On the osmotic behaviour of *Desulphovibrio desulphuricans*.
- CRAWFORD (K.) and ABRAHAM (E. P.). The synergistic action of cephalosporin C and benzylpenicillin against a penicillinase-producing strain of *Staphylococcus aureus*.
- BRIGGS (S.), CRAWFORD (K.), ABRAHAM (E. P.) and GLADSTONE (G. P.). Some properties of Gram-negative bacilli obtained from a strain of *Staphylococcus aureus* in the presence of benzylpenicillin.
- VLOEDMAN (D. A. JUN.), BERECH (J. JUN.), JEFFRIES (W. B.) and WAGTENDONK (W. J. van). Carbohydrate metabolism of *Paramoecium aurelia*, variety 4, stock 47.8 (sensitive).
- CHIN (B.) and KNIGHT (S. G.). Growth of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* in increased carbon dioxide tensions.
- KNOX (R.) and WOODROFFE (R.). Semi-solid agar media for rapid drug sensitivity tests on cultures of *Mycobacterium tuberculosis*.
- ROPER (J. A.) and KAER (E.). Acriflavine-resistant mutants of *Aspergillus nidulans*.
- TYRRELL (D. A. J.) and VALENTINE (R. C.). The assay of influenza virus particles by haemagglutination and electron microscopy.
- SHARPE (M. E.) and WHEATER (D. M.). *Lactobacillus helveticus*.
- VALENTINE (R. C.) and ISAACS (A.). The structure of viruses of the Newcastle disease-mumps-influenza (Myxovirus) group.
- HENDERSON (M. E. K.). Metabolism of methoxylated aromatic compounds by soil fungi.
- BAWDEN (F. C.) and PIRIE (N. W.). A virus-inactivating system from tobacco leaves.
- JACKSON (F. L.). Pyruvate accumulation and development of thiamine deficiency in cultures of *Proteus vulgaris*.
- BHASKARAN (K.) and GORRILL (R. H.). A study of antigenic variation in *Vibrio cholerae*.
- CARTWRIGHT (S. F.), PAY (T. W. F.) and HENDERSON (W. M.). Multiplication of the virus of foot-and-mouth disease in culture.
- BARKSDALE (W. L.), LI (K.), CUMMINS (C. S.) and HARRIS (H.). The mutation of *Corynebacterium pyogenes* to *Corynebacterium haemolyticum*.
- LINDENMANN (J.). The staining of influenza virus filaments.
- BUXTON (E. W.), LAST (F. T.) and NOUR (M. A.). Some effects of ultra-violet radiation on the pathogenicity of *Botrytis fabae*, *Uromyces fabae* and *Erysiphe graminis*.

The subscription rate is 90 s. net per volume of 3 parts,

Single parts 35 s. each, plus postage.

Two volumes will be issued each year. Orders should be sent to :

CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS

BENTLEY HOUSE, 200 EUSTON ROAD, LONDON, N. W. 1.

Le Gérant : G. MASSON.